

Identifizierung und Charakterisierung von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren und -Rezeptoren bei *Hydra*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ellen Lange

aus Weimar, Thr.

Marburg/Lahn 2016

Vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am

angenommen.

Erstgutachter: Frau Prof. Dr. Monika Hassel

Zweitgutachter: Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung am

Für meine Familie, die mich immer unterstützt hat.

Um die Welt in einem Sandkorn zu sehen
Und den Himmel in einer wilden Blume
Halte die Unendlichkeit auf deiner flachen Hand
Und die Stunde rückt in die Ewigkeit

W. Blake

Inhaltsverzeichnis

1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Summary.....	3
2 Einleitung.....	5
2. 1 Fibroblasten-Wachstumsfaktor/Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor Signalweg, ein Beispiel für einen evolutiv konservierten Signalweg.....	5
2. 1. 1 Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs).....	6
2. 1. 1. 1 Fibroblasten-Wachstumsfaktoren im Tierreich.....	6
2. 1. 1. 2 Die Größe und Struktur von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren.....	7
2. 1. 1. 3 Strukturelle und funktionelle Unterteilung der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren.....	9
2. 1. 1. 4 Funktionen von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren.....	11
2. 1. 2 Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (FGF-Rezeptoren).....	12
2. 1. 2. 1 FGF-Rezeptoren im Tierreich.....	13
2. 1. 2. 2 Die Struktur von FGF-Rezeptoren.....	14
2. 1. 3 Die Bindung zwischen FGF und FGFR und nachgeschaltete Signalkaskaden.....	15
2. 1. 4 Evolution von FGFs und FGF-Rezeptoren.....	17
2. 1. 5 FGF-Rezeptor Like1 (FGFRL1), ein fünftes Mitglied der FGFR Familie.....	18
2. 1. 5. 1 FGFRL1 im Tierreich.....	19
2. 1. 5. 2 Wirbeltier FGFRL1 ist in der Lage FGFs zu binden und agiert möglicherweise als negativer Regulator des FGF/FGFR-Signalweges.....	19
2. 1. 5. 3 Funktionen von FGFRL1.....	20
2. 2 <i>Hydra</i> ein basaler Modellorganismus zur Untersuchung entwicklungsbiologischer Prozesse.....	21
2. 2. 1 <i>Hydra</i> - Ein Süßwasserpolyt mit einfachem Körperbau.....	21
2. 2. 2 Fortpflanzung bei <i>Hydra</i>	26
2. 2. 2. 1 Sexuelle Fortpflanzung bei <i>Hydra</i>	26
2. 2. 2. 2 Asexuelle Fortpflanzung bei <i>Hydra</i>	27
2. 2. 3 Zell- und Gewebewanderung im adulten Tier und während der Knospung.....	29

2. 2. 4 Regeneration bei <i>Hydra</i>	31
2. 2. 5 Achsenbildung und Morphogenese bei <i>Hydra</i>	32
2. 2. 6 FGF/FGFR-Signalweg bei <i>Hydra</i>	33
2. 3 Ziel der Arbeit.....	34
3 Material und Methoden.....	35
3. 1 Materialien.....	35
3. 1. 1 Tiermaterial.....	35
3. 1. 1. 1 Versuchstiere.....	35
3. 1. 1. 2 Futtertiere.....	35
3. 1. 2 Bakterienstämme.....	35
3. 1. 3 Zelllinien.....	35
3. 1. 4 Vektoren.....	35
3. 1. 5 Marker.....	35
3. 1. 6 Lösungen.....	36
3. 1. 6. 1 Hydrahälterung.....	36
3. 1. 6. 2 Klonierung.....	36
3. 1. 6. 3 Pharmakologische Behandlungen.....	37
3. 1. 6. 4 <i>Whole Mount In situ</i> Hybridisierung auf ganze Tiere.....	37
3. 1. 6. 5 Western Blot.....	39
3. 1. 6. 6 Immunhistochemie ganzer Tiere.....	41
3. 1. 6. 7 Immunhistochemie Einzelzellpräparate.....	42
3. 2 Methoden.....	43
3. 2. 1 Die Hälterung von <i>Hydra</i>	43
3. 2. 2 Herstellung von Kopf- und Fuß-Regeneraten.....	43
3. 2. 3 RNA-Isolation mit Tri-Reagenz.....	43
3. 2. 4 First strand cDNA Synthese mit Fermentas Kit: RevertAid Permium-First Starnd cDNA Synthesis Kit #K1651/2.....	44
3. 2. 5 Primerdesign.....	44

3. 2. 6 Amplifizierung bestimmter DNA-Sequenzen.....	45
3. 2. 7 Erstellen einer Eichkurve zur Größenbestimmung von cDNA-Fragmenten, Sonden- größen und Proteinbanden.....	46
3. 2. 8 Klonierung von cDNA Fragmenten.....	46
3. 2. 8. 1 Ligantion mit T4-DAN Liganse.....	46
3. 2. 8. 2 Herstellung chemokompetenter <i>Escherichia coli</i> mit CaCl ₂	47
3. 2. 8. 3 Transformation in DH5 α <i>E. coli</i> Zellen.....	47
3. 2. 8. 4 Plasmid-Minipräparation mit QIAprep Spin Miniprep Kit #27104 (Qiagen).....	48
3. 2. 9 Herstellung von RNA-Sonden für die <i>Whole Mount In situ</i> Hybridisierung.....	48
3. 2. 10 Northern Blot.....	50
3. 2. 11 Dot Blot.....	51
3. 2. 12 <i>Whole Mount In situ</i> Hybridisierung (ISH).....	51
3. 2. 12. 1 Fixierung der Tiere für ISH.....	51
3. 2. 12. 2 Durchführung ISH.....	53
3. 2. 13 Epitopermittlung und Antikörperherstellung.....	54
3. 2. 14 Western Blot.....	55
3. 2. 15 Immunhistochemie (IHC) auf ganze Tiere.....	57
3. 2. 16 Immunhistochemie auf Mazerate.....	58
3. 2. 17 Pharmakologische Behandlungen.....	58
3. 2. 17. 1 Die Behandlung mit dem FGFR Inhibitor SU5402.....	58
3. 2. 17. 2 Die Behandlung mit den WNT-Signalweg-Aktivator Alsterpaullon.....	58
3. 2. 18 Datenbankrecherche.....	59
3. 2. 19 Phylogenetische Analyse.....	59
3. 2. 20 Sequenzanalyse.....	59
4 Ergebnisse.....	60
4. 1 FGFs bei <i>Hydra</i>	60
4. 1. 1 Datenbankrecherche zum Auffinden von <i>Hydra</i> FGFs.....	60
4. 1. 1. 1 Für die Gattung <i>Hydra</i> werden in den verschiedenen Datenbanken bis zu 11 FGFs vorhergesagt.....	60

4. 1. 2 Phylogenetische Analyse der <i>Hydra</i> FGFs.....	61
4. 1. 2. 1 Eingruppierung der <i>Hydra</i> FGFs erfolgt in drei der sieben FGF Unterfamilien der Vertebraten.....	61
4. 1. 3 Putative Struktur und Eigenschaften der abgeleiteten Proteinsequenzen, aus dem offenen Leseraster (ORF = <i>open reading frame</i>) von FGF-a bis FGF-f.....	63
4. 1. 4 Isolation und Klonierung der <i>Hydra vulgaris</i> AEP FGFs: FGF-a, FGF-b FGF-c FGF-e FGF-f.....	69
4. 1. 5 Verteilung der FGF-Transkripte in <i>Hydra vulgaris</i> AEP ist z.T. sehr spezifisch.....	70
4. 1. 5. 1 <i>fgf-a</i> , ein mögliches intrakrines FGF, wurde entlang Tentakel und oberhalb der Basalscheibe transkribiert.....	71
4. 1. 5. 2 <i>fgf-c</i> wurde unterhalb der Tentakelbasis und oberhalb der Basalscheibe transkribiert	72
4. 1. 5. 3 <i>fgf-e</i> wurde im adulten Tieren und während des gesamten Vorgangs der Knospung transkribiert.....	74
4. 1. 5. 4. 1 <i>fgf-f</i> wird an allen morphologischen Grenzen und Körperenden von <i>Hydra vulgaris</i> AEP transkribiert.....	77
4. 1. 5. 4. 2 <i>fgf-f</i> wird während der Regeneration von Kopf und Fuß erst spät transkribiert.....	80
4. 1. 5. 4. 3 Transkription von <i>fgf-f</i> weist Unterschiede zwischen <i>Hydra vulgaris</i> AEP und <i>Hydra vulgaris</i> Zürich auf.....	82
4. 1. 5. 5 Transkription von <i>fgf-c</i> , <i>fgf-e</i> und <i>fgf-f</i> in der Testes von <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	83
4. 1. 5. 5. 1 schwache <i>fgf-c</i> Transkription in der Testes von <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	84
4. 1. 5. 5. 2 <i>fgf-e</i> wird zu Beginn und gegen Ende der Testesentwicklung transkribiert.....	84
4. 1. 5. 5. 3 <i>fgf-f</i> wird noch vor dem Schichtbarwerden einer Testes transkribiert.....	85
4. 1. 6 Nachweis von FGF-f in <i>Hydra</i> -Proteinextrakten, bei intakten Polypen und Einzelzell-Präparaten.....	86
4. 1. 6. 1 Western-Blot-Analyse mit einem Peptid-Antikörper gegen FGF-f.....	87
4. 1. 6. 2 Western Blot Analyse und Immunhistochemie mit präabsorbierten Antikörper wies kaum unspezifische Antikörperbindung auf.....	88
4. 1. 6. 3 Immunhistochemie für FGF-f weist Protein an verschiedenen Stellen im Tier nach...	90
4. 1. 6. 4 Immunhistochemie an Einzelzellen weist FGF-f in Vesikeln im Zytoplasma ekto- und entodermaler Epithelzellen nach.....	99

4. 2 Identifikation weiterer FGF-Rezeptoren bei <i>Hydra vulgaris</i>	101
4. 2. 1 FGFR Proteinlokalisierung an verschiedenen Stellen im Polypen	101
4. 2. 2. 1 Putative Struktur und Eigenschaften der aus den FGFRb ORFs abgeleiteten Proteinsequenz.....	104
4. 2. 2. 2 Das räumlich-zeitliche Transkriptionsmuster von <i>fgfr-b</i> überlappt teilweise mit dem von <i>fgfr-a</i>	110
4. 2. 3. 1 Datenbankrecherche und Strukturanalyse zu einem möglichen HvFGFRL1.....	112
4. 2. 3. 2 Das Transkript von <i>hvfgrl1</i> befindet im adulten Tier und während der Knospung hauptsächlich im Bereich der Tentakel.....	114
4. 2. 3. 3 <i>hvfgrl1</i> Transkriptionsmuster bei der Regeneration von Kopf und Fuß	117
4. 2. 3. 4 Proteinanalyse von HvFGFRL1	119
4. 2. 3. 4. 1 Western-Blot-Analyse mit einem Peptid-Antikörper gegen HvFGFRL1.....	120
4. 3 Pharmakologische Behandlungen zur Analyse einer möglichen Regulation der Transkription von <i>fgf-c</i> und <i>fgf-f</i>	121
4. 3. 1 Die Behandlung mit dem FGFR-Inhibitor SU5402.....	121
4. 3. 1. 1 <i>fgf-f</i> Transkription ist an der Knospenbasis von SU5402 behandelten Tieren nicht mehr nachweisbar.....	122
4. 3. 2 Die Behandlung mit Alsterpaullon (ALP) zur Überaktivierung des WNT-Signalwegs..	122
4. 3. 2. 1 <i>fgf-c</i> Transkription verändert sich bei Überaktivierung des WNT-Signalwegs.....	123
4. 3. 2. 2 Dynamische <i>fgf-f</i> Transkription bei der Entstehung ektopischer Tentakeln durch die Überaktivierung des WNT-Signalwegs.....	124
4. 3. 2. 3 Die Transkription <i>hvfgrl1</i> verändert sich sehr stark bei Überaktivierung des WNT Signalwegs.....	126
5 Diskussion.....	129
5. 1 Die phylogenetische Zuordnung der <i>Hydra</i> FGFs deutet auf drei ursprüngliche FGFs hin	129
5. 2 Sequenzähnlichkeiten zwischen FGFRa und FGFRb von <i>Hydra vulgaris</i> AEP deuten auf linienspezifische Duplikation hin.....	132

5. 3 Die Transkriptionsmuster der <i>Hydra vulgaris</i> AEP FGFs und FGF-Rezeptoren deuten auf vielfältige und komplexe Funktionen des FGF/FGFR-Signalwegs in <i>Hydra vulgaris</i> AEP hin.....	132
5. 3. 1 FGF-a, ein möglicherweise intrakrines FGF	134
5. 3. 2. 1 Transkription von <i>fgf-c</i> spricht eher für ein Differenzierungssignal als für Chemoattraktion.....	134
5. 3. 2. 2 <i>fgf-c</i> Genregulation könnte indirekt über den WNT-Signalweg beeinflusst werden..	135
5. 3. 3. 1 FGF-e ist möglicherweise an der Knospenablösung beteiligt.....	136
5. 3. 3. 2 FGF-e spielt eventuell eine Rolle bei der Bildung von Körperöffnungen.....	136
5. 3. 3. 3 <i>fgf-e</i> Transkription im Stiel gibt noch Rätsel auf.....	136
5. 3. 4. 1 FGF-f könnte in niedriger Konzentration als chemoattraktives Signal wirken, und in hoher Konzentration Zelladhäsion induzieren.....	137
5. 3. 4. 2 FGF-f könnte auch für die Etablierung von Grenzen und Morphogenese bei <i>Hydra</i> wichtig zu sein.....	138
5. 3. 4. 3 <i>fgf-f</i> Transkriptionsvergleich zwischen <i>Hydra vulgaris</i> AEP und <i>Hydra vulgaris</i> Zürich spricht möglicherweise für eine konservierte Funktion von FGF-f.....	139
5. 3. 4. 4 <i>fgf-f</i> könnte dem Anschein nach über den FGF/FGFR-Signalweg und/oder WNT-Signalweg reguliert werden.....	139
5. 3. 5 Die FGFR Proteinlokalisierung spricht für Beteiligung an der Knospenablösung und eine mögliche Interaktion mit FGF-f.....	141
5. 3. 5. 1 Die Lokalisation des FGFR Proteins an der Knospenbasis untermauert die Aussage: FGFRa ist essentiell für die Knospenablösung.....	141
5. 3. 5. 2 Die Lokalisation der Proteine von FGF-f und FGFR deutet auf eine mögliche Interaktion zwischen beiden hin.....	141
5. 3. 6 Die Rezeptoren FGFRb und HvFGFRL1 deuten auf komplexe Funktionen und Regulation des FGF/FGFR-Signalwegs hin.....	142
5. 3. 6. 1 FGFRb ist möglicherweise auch an der Knospenablösung beteiligt.....	142
5. 3. 6. 2. 1 HvFGFRL1 agiert möglicherweise als Negativ-Regulator für den FGF/FGFR Signalweg.....	143
5. 3. 6. 2. 2 HvFGFRL1 nimmt möglicherweise Einfluss auf die Zellwanderung und reguliert die Anzahl der Tentakel.....	143

5. 4 Modelle zu möglichen Funktionen der <i>Hydra</i> FGFs und der <i>Hydra</i> FGF-Rezeptoren.....	144
5. 4. 1 Modell zur Funktion von FGF-c, FGF-f und HvFGFRL1 während der Entstehung von Batteriezellen und der Wanderung von ektodermalen Epithelzellen ins Hypostom....	145
5. 4. 2 Modell zur Funktion von FGF-f während der Wanderung von Nematoblasten.....	146
5. 4. 3 Modell zur Funktion von FGF-c, FGF-e und FGF-f während der Entstehung der Testes und Spermatogenese.....	147
5. 5 Fazit.....	149
5.6 Ausblick.....	149
6 Literatur.....	150
7 Anhang.....	168
8 Abkürzungsverzeichnis.....	185
9 Abbildungsverzeichnis.....	190
10 Tabellenverzeichnis.....	194
11 wissenschaftlicher Werdegang.....	195
12 Danksagung.....	196
13 Erklärung.....	197

1. 1 Zusammenfassung

Bei FGFs handelt es sich um kleine, meist extrazellulär agierende, Signalmoleküle. Sie sind sowohl bei Vertebraten, als auch bei Invertebraten vorhanden. Vertebraten besitzen abhängig von der Spezies zwischen 19 (*Gallus gallus*) und 27 (*Danio rerio*) verschiedene FGFs. Innerhalb der Invertebraten ist die Anzahl an FGFs weitaus geringer. Die Größe der FGFs liegt bei Vertebraten zwischen 17 kDa und 34 kDa und bei Invertebraten zwischen 21 kDa und 86 kDa. Aufgrund starker struktureller Ähnlichkeiten innerhalb der für FGF typischen Core-Region, auch über die Spezies hinweg, lassen sich die FGFs der Vertebraten, z.T. auch die der Invertebraten, in 7 Unterfamilien einteilen. Funktionell sind FGFs an verschiedenen entwicklungsbiologischen Prozessen, wie z.B. am Auswachsen von Gliedmaßenknospen, an der Etablierung von Grenzen und der Tubulogenese beteiligt. Dabei vermitteln FGFs konzentrationsabhängig über die Bindung an FGF-Rezeptoren u.a. Zellmigration, Zelldifferenzierung und Zelladhäsion.

FGF-Rezeptoren sind membranständige Rezeptoren, die zur Superfamilie der Rezeptor-Tyrosinkinasen gehören. Vertebraten besitzen vier kanonische und einen nicht-kanonischen FGF-Rezeptor. Invertebraten haben ein bis zwei kanonische und einen nicht-kanonischen FGF-Rezeptor. Dem nicht-kanonischen FGF-Rezeptor, FGFRLike1, fehlt intrazellulär die Tyrosinkinase-Domäne. Er wird daher als ein möglicher Negativ-Regulator des FGF/FGFR-Signalweges angesehen.

Zur Evolution der FGFs gibt es verschiedene Hypothesen. Zum einen wird diskutiert, ob aus wenigen FGFs im Laufe der Evolution viele entstanden sind oder umgekehrt. Im Falle der FGF-Rezeptoren wird von einem ursprünglichen Rezeptor ausgegangen, aus dem durch linienspezifische Duplikationen die ein bzw. zwei FGF-Rezeptoren der Invertebraten entstanden sind. Die vier FGF-Rezeptoren der Wirbeltiere entstanden während einer zweiten Phase der Vertebraten-Genexpansion.

Für *Hydra* ist in Bezug auf den FGF/FGFR-Signalweg nur wenig bekannt. Frühere Arbeiten zeigen, dass *Hydra vulgaris* Zürich einen FGF-Rezeptor, FGFRa, und ein mögliches FGF, HvFGF1/2, besitzt. FGFRa ist essentiell für die Ablösung der Knospe. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach weiteren putativen FGFs und FGF-Rezeptoren gesucht. Diese wurden anschließend in Bezug auf Struktur, Transkription und z.T. Proteinlokalisierung hin untersucht, um so Aussagen über mögliche Eigenschaften und Funktionen, sowie über die Evolution von FGFs und FGFRs treffen zu können.

Die phylogenetische Einordnung der FGFs von *Hydra* unterstützt die Hypothese, dass es ursprünglich wenige FGFs gab. Die Daten deuten an, dass der gemeinsame Vorfahr von *Hydra* und den Bilateria 3 FGFs besaß. Sowohl die Transkriptionsmuster der 4 FGFs aus

Hydra vulgaris AEP, als auch die Proteinlokalisierung von FGF-f deuten an, dass auch der FGF/FGFR Signalweg in *Hydra* vielfältige Funktionen erfüllt. Zwei weitere FGF-Rezeptoren, FGFRb und HvFGFRL1, konnten ebenfalls identifiziert werden. FGFRb, ein zweiter kanonischer FGFR, könnte eventuell redundant zu FGFRa agieren. Bei HvFGFRL1 könnte es sich um einen Negativ-Regulator des FGF/FGFR-Signalweges handeln, der Einfluss auf die Zellwanderungsgeschwindigkeit ins Hypostom und auf die Lokalisation der Tentakel nimmt. Die Ergebnisse meiner Arbeit machen deutlich, dass der FGF/FGFR Signalweg, was die Zahl an Liganden und Rezeptoren, aber auch die möglichen Funktionen, angeht, schon im Vorläufer von *Hydra* und Bilateria sehr komplex gewesen sein muss.

1. 2 Summary

FGFs are small signaling polypeptides and most of them act extracellularly. They exist in invertebrates and vertebrates. In the latter between 19 (*Gallus gallus*) and 27 (*Danio rerio*) different FGFs are known, while within the invertebrates, the number of FGFs is much lower. The size of FGFs varies between 17 kDa and 34 kDa in vertebrates and between 21 kDa and 86 kDa in invertebrates. The high structural similarity within the typical FGF core region, even across species, allows their classification into seven subfamilies. FGFs are involved in different developmental processes, like limb bud development, establishment of boundaries or tubulogenesis. By binding to an FGF receptor, FGFs control, in a concentration-dependent manner, e.g. cell migration, cell differentiation and cell adhesion.

FGFRs are membrane bound receptors and belong to the superfamily of receptor tyrosine-kinases. There are four canonical and one non-canonical FGFR in vertebrates, and up to two canonical and one non-canonical FGFR in invertebrates. In contrast to canonical FGFRs, the non-canonical receptor, FGFR1, lacks a tyrosine kinase domain and is supposed to be a negative regulator for the FGF/FGFR signaling pathway.

Two hypotheses are discussed to explain the evolution of FGFs. One claims that only few FGFs existed in the Urmetazoa, the other one claims that multiple FGFs existed already. In the case of FGFRs, it is assumed that a single ancestral receptor sequence underwent duplication in the invertebrate phyla independently. The four vertebrates FGFRs emerged during a second phase of gene duplication.

Very little is known about the FGF/FGFR signaling pathway in *Hydra*. Earlier studies indicated the presence of one FGF-receptor, FGFRa, and one possible FGF, HvFGF1/2 in *Hydra vulgaris* Zürich. FGFRa is essential for the bud detachment. In this thesis, I identified the full set of *Hydra* FGFs and FGFRs, investigated their phylogeny, their gene expression patterns and protein localization. These studies allowed predictions about potential functions as well as the evolution of FGFs and FGFRs.

The phylogeny of the *Hydra* FGFs supports the hypothesis that it was originally only few FGFs. The data suggest, that there were three FGFs in the ancestor of *Hydra* and Bilateria. The transcription pattern of the four *Hydra vulgaris* AEP FGFs and the protein localization of FGF-f indicated that the FGFs probably have multiple functions in *Hydra*. Two more FGFRs, FGFRb and HvFGFR1 were identified. FGFRb, a second canonical FGFR, might act redundantly to FGFRa, while HvFGFR1 has the potential to act as a negative regulator of the FGF/FGFR signaling pathway with respect to the differential speed of cell migration into the hypostome and the tentacles. Concerning the number and expression patterns of ligands and receptors,

my data shows that the FGF/FGFR tool kit was already complex in the ancestor of *Hydra* and Bilateria.

2 Einleitung

Um zu verstehen, „...was die Welt im Innersten zusammen hält...“ (Doktor Faust, Goethes Faust, der Tragödie erster Teil), ist es notwendig herauszufinden, wie es möglich war, dass im Laufe der Evolution innerhalb des Tierreiches so viele verschiedene Arten entstehen konnten. Für die Entstehung vielzelliger tierischer Organismen brauchte es die Entwicklung von echten Geweben und Epithelien; dabei spielen eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen, wie Zellteilung und Zelldifferenzierung, Zell-Zell-Kommunikation, Wachstum, Morphogenese und Musterbildung eine wichtige Rolle (Thisse und Thisse, 2005). Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die verschiedensten Lebewesen, sei es nun Fliege oder Mensch, ähnliche Mechanismen während der Entwicklung nutzen (Holland, 1999). Um einen Einblick in die Entstehung und Evolution von vielzelligen Organismen zu erhalten, lohnt es sich, verschiedene, konservierte Signalwege und auch das Expressionsmuster entwicklungsrelevanter Gene zu untersuchen. Zudem kann ein Blick auf basale Organismen Aufschluss darüber geben, wie konserviert ein Signalweg ist und wie sich dieser im Laufe der Evolution verändert hat.

2. 1 Fibroblasten-Wachstumsfaktor/Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor Signalweg, ein Beispiel für einen evolutiv konservierten Signalweg

Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor/Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGF/FGFR) Signalweg ist innerhalb der Eumetazoa, von den Cnidaria bis zu den Vertebraten, zu finden (Sudhop et al., 2004; Matus et al., 2007; Bertrand et al., 2013). Er ist an verschiedenen entwicklungsbiologischen Prozessen, wie z.B. dem Auswachsen von Gliedmaßen-Knospen bei Vertebraten und der Verzweigung des Tracheensystems von *Drosophila melanogaster*, beteiligt (Sutherland et al., 1996; Lewandoski et al., 2000). Aktiviert wird der Signalweg durch die extrazelluläre Bindung des Liganden, den Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (engl. fibroblast growth factors, FGFs), an einen membranständigen Rezeptor, den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl. fibroblast growth factor receptor, FGF-Rezeptor), welcher das Signal in die Zelle weiterleitet.

2. 1. 1 Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs)

FGFs sind eine Gruppe von zumeist extrazellulär agierenden Signalmolekülen. Ihren Namen erhielten sie, weil eine erste Funktion, die ihnen zugeschrieben werden konnte, die Stimulation des Wachstums von Maus-Fibroblasten war (Gospodarowicz et al., 1978).

FGFs sind Liganden für FGF-Rezeptoren und spielen eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung, bei der Regulation von Zellproliferation, -migration und -differenzierung (Johnson und Williams, 1993). Im adulten Tier spielen sie unter anderem bei der Wundheilung, der Geweberegeneration und der Angiogenese eine Rolle (Itoh und Ornitz, 2004; Popovici et al., 2005).

2. 1. 1. 1 Fibroblasten-Wachstumsfaktoren im Tierreich

FGFs sind im gesamten Tierreich vertreten. Man findet sie sowohl bei Invertebraten, als auch bei Vertebraten (Abb. 2.1) (Bertrand et al., 2013). Am besten untersucht sind die FGFs der Vertebraten, vor allem bei Mensch und Maus. Vertebraten besitzen, abhängig von der Spezies, zwischen 19 (*Gallus gallus*) und 27 (*Danio rerio*) verschiedene FGFs (Oulion et al., 2012). Mensch und Maus besitzen jeweils 22 FGFs, FGF1-23, wobei beim Menschen FGF15 und bei Maus FGF19 fehlt, da das humane FGF19 das Ortholog zu Maus-FGF15 ist (Ornitz und Itoh, 2001; Oulion et al., 2012).

Die Anzahl der Invertebraten FGFs ist weitaus geringer. *Drosophila melanogaster* besitzt neben den zwei FGFs Pyramus und Thisbe (Stathopoulos et al., 2004) noch ein drittes, für Arthropoden spezifisches FGF namens Branchless (Sutherland et al., 1996, Oulion et al., 2012). Branchless ist beispielsweise auch bei *Tribolium castaneum* vorhanden (Beermann und Schröder, 2009). Außer Branchless besitzt *Tribolium* drei weitere FGF: Tc-FGF1a und 1b und Tc-FGF8. FGFs sind auch bei Nematoden zu finden. So besitzt *Caenorhabditis elegans* zwei FGFs LET-756 (lethal protein 756) und EGL-17 (egg laying defective 17) (Burdine et al., 1997). *Ciona intestinalis*, ein Vertreter der Tunicata, besitzt die 6 FGFs Ci-FGF3/7/10/22, Ci-FGF4/5/6, Ci-FGF8/17/18, Ci-FGF9/16/22, Ci-FGF11/12/13/14 und Ci-FGFL (Satou et al., 2002). Des Weiteren sind FGF auch innerhalb der Lophotrochozoa, sowie Cephalochordata und Ambulacraria zu finden (Abb. 2.1) (Oulion et al., 2012, Bertrand et al., 2013).

FGFs sind auch bei basalen Tierstämmen, wie den Cnidaria, vorhanden. Im Genom der Sternchenanemone *Nematostella vectensis* wurden 15 FGFs, unter anderem *NvFGF8A*, *NvFGF8B*, *NvFGFa1* und *NvFGFa2* identifiziert (Matus et al., 2007; Rentzsch et al., 2008). Bei

Hydra vulgaris wurde ein mögliches FGF, HvFGF1/2 entdeckt (nicht publizierte Daten, Sudhop, 2006). Ob und wie viele FGFs es bei *Hydra* noch gibt, ist noch nicht geklärt.

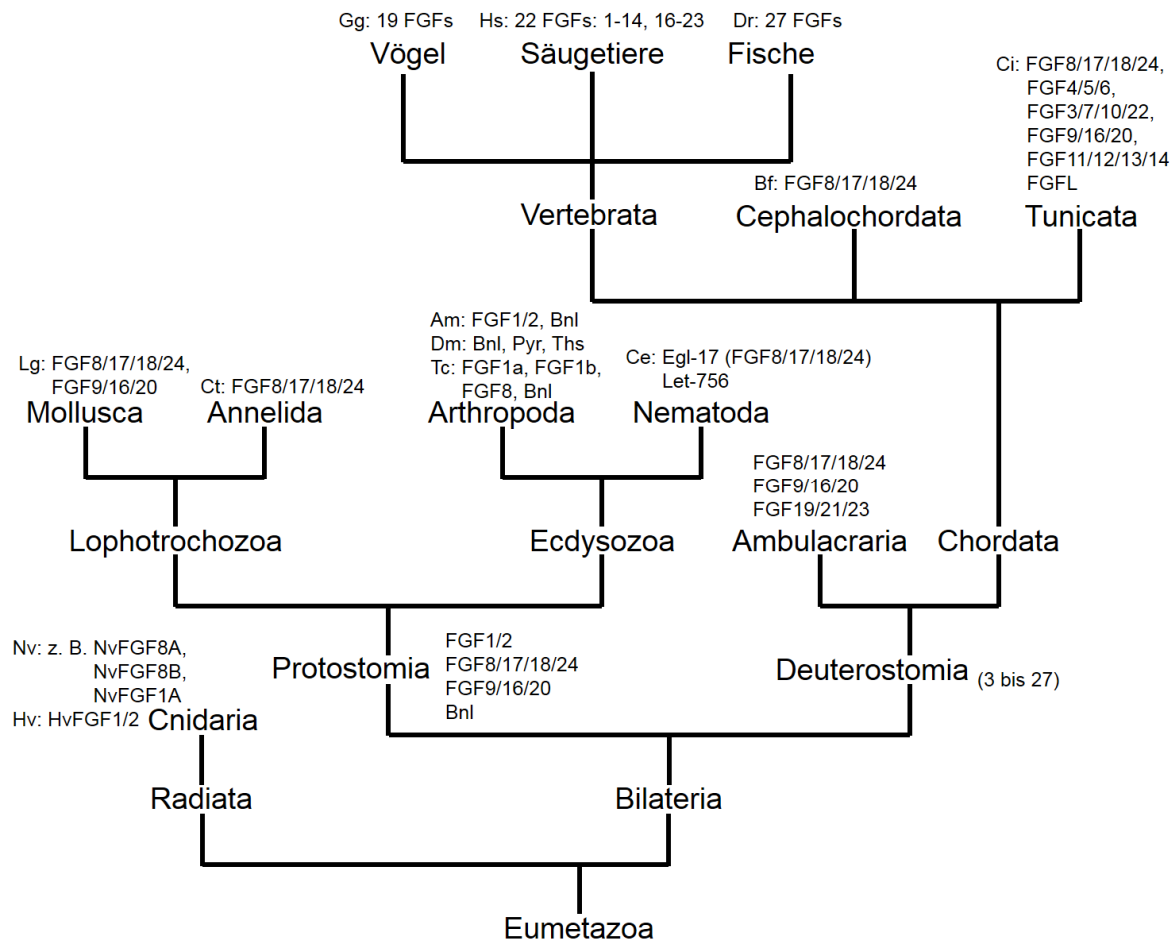


Abbildung 2.1: FGFs im Tierreich.

Hv: *Hydra vulgaris*, Nv: *Nematostella vectensis*, Lg: *Lottia gigantea*, Ct: *Capitella teleta*, Tc: *Tribolium castaneum*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Am: *Apis mellifera*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Ci: *Ciona intestinalis*, Bf: *Branchiostoma floridae*, Gg: *Gallus gallus*, Hs: *Homo sapiens* und Dr: *Danio rerio*; Bnl: Branchless, Pyr: Pyramus, Ths: Thisbe.

[erstellt nach: Itoh und Ornitz, 2004; Popovici et al., 2005; Itoh und Ornitz, 2011; Oulion et al., 2012]

2. 1. 1. 2 Die Größe und Struktur von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren

Die Größe der FGFs der Vertebraten liegt zwischen 17 kDa und 34 kDa, die Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zwischen 13 % und 71 % (Ornitz und Itoh, 2001). Die Größe der Invertebraten FGFs variiert dagegen sehr stark. Die größten FGFs sind, mit 82 kDa bis 86 kDa Branchless, Pyramus und Thisbe (Sutherland et al., 1996; Stathopoulos et al., 2004). Ci-FGFL ist mit einer Größe von 75 kDa ebenfalls sehr groß. Ähnlich groß, wie die Vertebraten FGFs,

sind die *C. intestinalis* FGFs FGF3/7/10/22, FGF4/5/6, Ci-FGF9/16/20 und Ci-FGF11/12/13/14. Ihre Größe liegt zwischen 21 kDa und 31 kDa (Satou et al., 2002).

In Bezug auf ihre Primärsequenz sind FGFs auf den ersten Blick sehr verschieden. Sie besitzen zum Teil unterschiedlich lange N- und C-Termini (Popovici et al. 2005). Sehr lange N-terminale Enden haben FGFL von *C. intestinalis* (371 Aminosäuren (AS)) und Branchless (246 AS) von *D. melanogaster* (Popovici et al. 2005). Die längsten C-terminalen Enden, mit einer Länge von 598 bzw. 606, haben die FGFs Thisbe und Pyramus von *D. melanogaster*. N-terminal besitzen die Wirbeltier FGFs 3-10 und 16-23 ein Signalpeptid (SP) für die Sekretion (Abb. 2.2). Den FGFs 1 (saures FGF) und 2 (basisches FGF) fehlt ein SP (Abb. 2.2). Sie werden möglicherweise mittels Exozytose, unabhängig vom ER (endoplasmatisches Retikulum)-Golgi-Weg, oder aus verletzten Zellen, freigesetzt (Ornitz und Itoh 2001; Itoh und Ornitz, 2011; Oulion et al., 2012). Sie können aber, wie auch FGF3, N-terminal eine NLS (nuclear localization signal = Kern-Lokalisierungs-Sequenz) besitzen und im Kern nachgewiesen werden (Prochiantz und Théodore, 1995; Antoine et al., 1997). Ebenfalls kein SP für die Sekretion besitzen die FGFs 11-14 (Abb. 2.2). Sie sind intrazellulär im Zytoplasma oder, wenn sie eine NLS besitzen, im Zellkern lokalisiert (Zhang et al. 2012). Trotz der Unterschiede in der Länge von N- und C-Terminus und ob ein SP vorhanden ist oder nicht, besitzen alle FGFs eine konservierte Core-Region von etwa 120 AS (Abb. 2.2), die aus 12 anti-parallelen β -Faltblättern besteht (Abb. 2.3) (Zhu et al., 1991; Beenken und Mohammadi, 2009). Innerhalb der Core-Region liegt, bei den meisten FGFs, eine Heparinbindestelle für die Bindung von Heparansulfat (HS) bzw. Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) (Abb. 2.2) (Ornitz, 2000). HS bzw. HSPGs dienen u.a. als Kofaktoren für die Bindung des FGFs an den Rezeptor (Ornitz, 2000; Schlessinger et al., 2000; Pellegrini 2001; Lin, 2004). Inner- und zwischenartliche Vergleiche zeigten, dass die Core-Regionen der einzelnen FGFs zwischen den Arten sich ähnlicher sind, als die FGFs innerhalb einer Art (Coulier et al., 1997). Das heißt FGF4 aus Mensch, Maus und Frosch sind sich ähnlicher, als zum Beispiel die FGFs des Menschen untereinander. Zusätzlich unterscheidet sich die Core-Region der Vertebraten von der, der Invertebraten.

parakrine FGFs	FGF3-8, 10, 17, 18, 22	SP		HS	Core-Region	
	FGF9, 16, 20	SP*		HS	Core-Region	
endokrine FGFs	FGF15/19, 21, 23	SP			Core-Region	
intrakrine FGFs	FGF11-14	NLS		HS	Core-Region	
und						
parakrine FGFs	FGF1, 2			HS	Core-Region	

Abbildung 2.2: Schematische Struktur der Wirbeltier FGFs.

SP: Signalpeptid zur Sekretion, SP*: hydrophobe Sequenz zur Sekretion, HS: Heparinbindestelle innerhalb der Core-Region, NLS: Kern-Lokalisierungs Sequenz.

[verändert nach: Itoh und Ornitz, 2011]

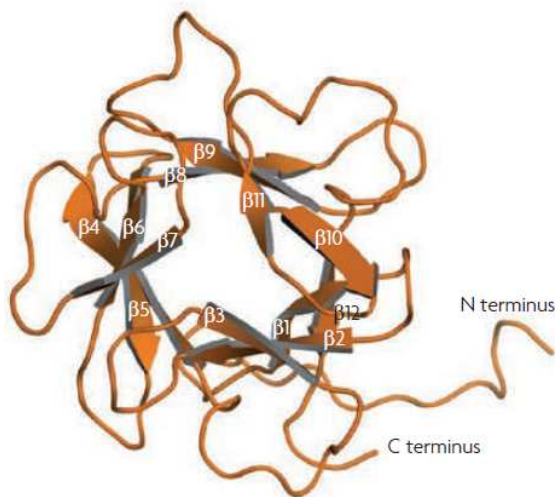


Abbildung 2.3: Proteinstruktur des humanen FGF1 mit 12 anti-parallelen β -Faltblättern.

β 1- β 12: β -Faltblatt 1-12.

[Beenken und Mohammadi, 2009]

2. 1. 1. 3 Strukturelle und funktionelle Unterteilung der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren

Aufgrund der Tatsache, dass einige FGFs zu einander und auch über die Spezies hinweg sehr ähnlich sind, kann man die Superfamilie der FGFs in Unterfamilien einteilen. Die Einteilung erfolgt anhand der humanen FGF, da diese bis heute am besten untersucht sind. Abhängig davon, ob FGF3 als eigene Unterfamilie angesehen wird, erhält man 7 oder 8 Unterfamilien für die humanen FGFs (Abb. 2.4) (Itoh und Ornitz, 2004; Oulion et al., 2012). Bei den Unterfamilien, die aus 2-4 Mitgliedern bestehen, handelt es sich um die Unterfamilien 1/2;

4/5/6; 3/7/10/22; 8/17/18/24¹; 9/16/20; 19/21/23 und 11/12/13/14 (Abb. 2.4). Popovici et al. (2005) halten eine weitere Unterfamilie für möglich. Sie gruppieren Branchless zusammen mit viralen FGFs, die in Arthropoden-spezifischen Baculoviren gefunden wurden, in eine eigene Gruppe.

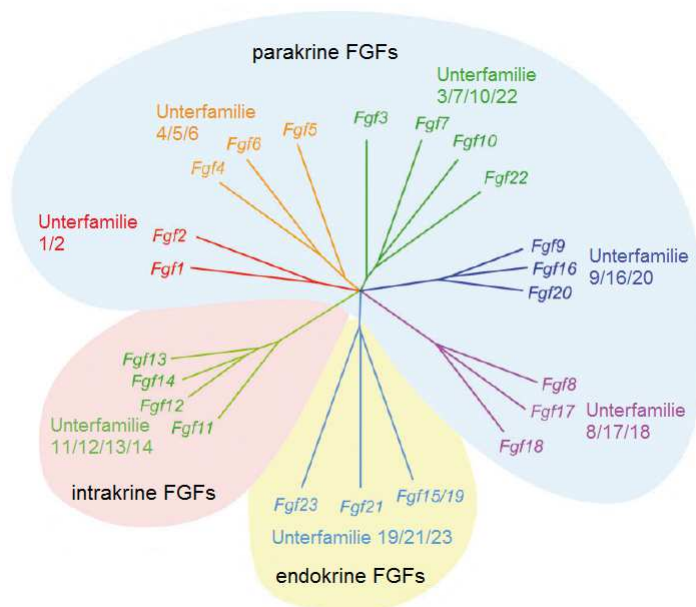


Abbildung 2.4: Einteilung der 22 Wirbeltier FGFs in 7 Unterfamilien.
[verändert nach: Ornitz und Itoh, 2015]

Des Weiteren lassen sich die FGFs anhand ihrer Wirkungsweise unterteilen. Die FGFs 11-14 zählen zu den intrakrinen FGFs (Abb. 2.4). Sie agieren nur intrazellulär und binden nicht an FGF-Rezeptoren (Itoh und Ornitz 2011). Eine zweite Gruppe, die sogenannten parakrinen FGFs (Abb. 2.4), werden sekretiert und interagieren mit FGF-Rezeptoren. Ihre Reichweite ist aufgrund ihrer hohen Affinität zu HS bzw. HSPGs der extrazellulären Matrix nur sehr gering. Sie wirken somit in der Nähe ihres Freisetzungsortes. Zu ihnen gehören die FGFs 1-10, 16-18, 20 und 22. Die dritte Gruppe sind die endokrinen FGFs. Zu ihnen zählen die FGF 15/19, 21 und 23 (Abb. 2.4). Da sie nur eine geringe Affinität zu HS bzw. HSPGs haben, ist ihre Reichweite größer als die der parakrinen FGFs (Itoh und Ornitz 2011; Beenken und Mohammadi 2012).

Die FGFs der Invertebraten lassen sich gut den Unterfamilien der Vertebraten zuordnen. Lediglich die endokrinen FGFs (FGF15/19, 21 und 23) sind Vertebraten-spezifisch und innerhalb der Invertebraten nicht zu finden (Itoh, 2010). Der Vergleich mit den humanen FGFs zeigt, dass sich Pyramus und Thisbe in die Unterfamilie 8/17/18/24 eingruppierten lassen

¹ 24: FGF24 der Fische

(Stathopoulos et al., 2004). Tc-FGF1a und 1b gruppiert man in die Unterfamilie 1/2 und Tc-FGF8 wird der Unterfamilie 8/17/18/24 zugeordnet. LET-756 wird in die Unterfamilie 9/16/20 und EGL-17 (egg laying defective 17) in die Unterfamilie 8/17/18/24 eingruppiert (Burdine et al., 1997; Popovici et al., 2005). 5 der 6 FGFs von *Ciona intestinalis* lassen sich ebenfalls einzelnen Unterfamilien der Vertebraten zuordnen, dies wird durch ihre Namen deutlich: Ci-FGF3/7/10/22, Ci-FGF4/5/6, Ci-FGF8/17/18, Ci-FGF9/16/20 und Ci-FGF11/12/13/14. Ein Zuordnung des sechsten FGF (Ci-FGFL) war bis jetzt nicht möglich (Satou et al., 2002). Dass die Einordnung der Invertebraten FGF in die Unterfamilien der Vertebraten durchaus berechtigt ist und der FGF/FGFR Signalweg stark konserviert ist, konnten Popovici et al. (2004) zeigen. Sie waren in der Lage mittels Einfügen der Core Region von Mitgliedern der Vertebraten FGF9/16/20 Familie let-756-Mutanten von *C. elegans* zu retten. Die Eingruppierung der FGFs der Cnidaria in die Unterfamilien der FGFs ist schwieriger. *NvFGF8A*, *NvFGF8B* werden mit in die Unterfamilie 8/17/18/24 gruppiert, *NvFGFa1* ließ sich nicht zuordnen (Matus et al., 2007; Rentzsch et al., 2008).

2. 1. 1. 4 Funktionen von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren

Die intrakrinen FGF wirken, wie schon erwähnt, intrazellulär und damit unabhängig von FGF-Rezeptoren. Sie interagieren unter anderem mit der intrazellulären Domäne von spannungsabhängigen Natriumkanälen in Nervenzellen (Goldfarb et al., 2007; Itoh und Ornitz 2011; Zhang et al. 2012). FGF13, ein Mikrotubuli-Stabilisierungsprotein, ist z.B. wichtig für die Polarisation und Migration von Nervenzellen bei der Entstehung der Großhirnrinde bei *Mus musculus* (Zhang et al. 2012; Wu et al., 2012). Bei einem *knockout* von FGF14 bzw. bei der Mutation von FGF14 entwickeln Mäuse und Menschen zerebrale Ataxie (Bewegungsstörung) (Xiao et al., 2007; Shakkottai et al., 2009; Brusse et al., 2006).

Extrazellulär agierende FGFs lassen sich in endokrin und parakrin wirkende FGFs unterteilen. Endokrine FGFs können aufgrund ihrer geringen Affinität zu HS/HSPG, die unter anderem ein Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM) sind, auch an weiter entfernten Orten bzw. über größere Entfernungen hinweg wirken. Endokrine FGF agieren hauptsächlich im adulten Tier, wo sie am Energie- und Fettstoffwechsel (FGF21), sowie am Phosphat/Vitamin D Metabolismus (FGF23) beteiligt sind (Itoh, 2010; Itoh und Ornitz 2011). Aber auch für die Embryonalentwicklung sind sie nötig. So regulieren sie z.B. die Zellteilung im embryonalen Gehirn und sind an der Ausbildung des Herzausflusstraktes beteiligt (FGF15/19) (Itoh, 2010; Itoh und Ornitz 2011).

Die starke Affinität der parakrinen FGFs zu HS bzw. HSPGs beschränkt ihre Wirkungsreichweite (Nybakken und Perrimon, 2002). Sie sind vor allem während der Embryonalentwicklung von Bedeutung und agieren als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und sind wichtig für die Entwicklung von Organen, wie Herz, Lunge, Innenohr und Niere bei Wirbeltieren (Urness et al., 2011, Itoh und Ornitz, 2004; Ornitz und Itoh, 2015). Die FGFs 1 und 2 spielen, wenn sie im Zellkern lokalisiert sind, eine Rolle bei der Steuerung des Zellzyklus, bei der Zelldifferenzierung und beim Überleben und Apoptose von Zellen bei Vertebraten (Bouleau et al., 2005; Rodriguez-Enfedaque et al., 2009; Claus et al., 2003). FGF2 *knockout* Mäuse weisen Defekte, wie verminderte Neuronenzahl, bei der Neurogenese des zerebralen Kortex (Raballo et al., 2000) und Knochendefekte auf (Itoh und Ornitz, 2004).

FGF8 ist eines der vielfältigsten FGFs mit distinkter Funktion und ist während der gesamten Embryonalentwicklung der Vertebraten wichtig. Es wird, beispielweise zusammen mit FGF4, während der Gastrulation beim Hühnerembryo benötigt, damit Zellen aus der Primitivrinne auswandern können (Sun et al., 1999). Yang et al. (2002) konnten zeigen, dass FGF8 hierbei eine negative Chemotaxis vermittelt, sodass die Zellen nicht in Richtung FGF8 wandern, sondern in Richtung FGF4, das eine positive Chemotaxis vermittelt. Auch für die Bildung von Somiten während der Embryonalentwicklung vom Maus und Huhn wird FGF8 benötigt (Naiche et al., 2011). Weiterhin ist FGF8 für das Auswachsen von Gliedmaßenknospen bei Huhn, Maus und Fledermaus essenziell (Lewandoski et al., 2000; Moon und Capecchi, 2000; Hockman et al., 2008). Unter der Regulation des WNT-Signalweges, ist FGF8 nötig für die Ausbildung von Sekundärachsen, z.B. der links-rechts Achse beim Huhn, der dorsal-ventral Achse bei *Drosophila melanogaster* und der anterior-posterior Achse bei Säugern (Gilbert, 2014). Des Weiteren ist FGF8 wichtig für die Tubulogenese während der Nierenentwicklung (Perantoni et al., 2005; Atsuta et al., 2015), und für die Entwicklung des Herzens, des Innerohrs und in der Spermatogenese (Ornitz und Itoh, 2015). Zusammen mit FGF17 und FGF18 ist FGF8 auch nötig für die Proliferation und Differenzierung von Zellen im Cerebellum (Xu et al., 2000).

2. 1. 2 Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (FGF-Rezeptoren)

Bei Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren handelt es sich um membranständige Rezeptoren (Lee et al., 1989), die zur Superfamilie Rezeptor-Tyrosinkinasen gehören. Im Zusammenspiel mit ihren Liganden (Tab. 2.1), sind sie an einer Vielzahl von Prozessen während der Embryonalentwicklung und im adulten Tier beteiligt (Abschnitt 2. 1. 1. 4).

Tabelle 2.1: FGF-FGFR Liganden-/Rezeptor-Bindung

Die unterschiedlichen FGFs binden verschiedene Isoformen der FGF-Rezeptoren und nutzen verschiedene Kofaktoren. b, c: Isoformen b, c.

[erstellt nach: Powers et al., 2000; Eswarakumar et al., 2005; Holzmann et al., 2011; Belov und Mohammadi, 2013 und Ornitz und Itoh, 2015]

Ligand	Rezeptorbindung	Kofaktor
FGF1	alle FGFRs	HS/HSPG
FGF2	FGFR1b, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4	HS/HSPG
FGF3	FGFR1b, FGFR2b	HS/HSPG
FGF4	FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4	HS/HSPG
FGF5	FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c	HS/HSPG
FGF6	FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4	HS/HSPG
FGF7	FGFR2b	HS/HSPG
FGF8	FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4	HS/HSPG
FGF9	FGFR3b, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4	HS/HSPG
FGF10	FGFR1b, FGFR2b	HS/HSPG
FGF11-14	FGFR unabhängig	unbekannt
FGF15/19	FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4	β Klotho
FGF16	FGFR3b, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4	HS/HSPG
FGF17	FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4	HS/HSPG
FGF18	FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4	HS/HSPG
FGF20	FGFR3b, FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4	HS/HSPG
FGF21	FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c	β Klotho
FGF22	FGFR1b, FGFR2b	HS/HSPG
FGF23	FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4	α Klotho

2. 1. 2. 1 FGF-Rezeptoren im Tierreich

FGF-Rezeptoren sind, wie ihre Liganden, im gesamten Tierreich vorhanden. Vertebraten besitzen 4 Rezeptoren, FGFR1-4. Die Anzahl der FGF-Rezeptoren innerhalb der Invertebraten variiert. *D. melanogaster* besitzt zwei FGF-Rezeptoren, Breathless und Heartless (Shishido et al., 1993). Für *T. castaneum* dagegen ist nur ein FGFR, Tc-FGFR (Sharma et al., 2015) bekannt. *C. elegans* besitzt ebenfalls nur einen FGFR, EGL-15 (DeVore et al., 1995) und auch *Ciona intestinalis* hat nur einen FGFR (Rebscher et al., 2009). Innerhalb der Cnidaria konnten bei *N. vectensis* 2 FGF-Rezeptoren, NvFGFRa und b, identifiziert werden und auch bei *Hydra*

vulgaris und *Hydra magnipapillata* sind zwei FGF-Rezeptoren (FGFRa und FGFRb) bekannt (Sudhop et al., 2004; Matus et al., 2007; Rudolf et al., 2013).

2. 1. 2. 2 Die Struktur von FGF-Rezeptoren

FGF-Rezeptoren lassen sich strukturell in eine extrazelluläre, eine Transmembran- und eine intrazelluläre Domäne unterteilen (Abb. 2.5 A). N-terminal besitzt die extrazelluläre Domäne ein SP, was dazu führt, dass der Rezeptor in der Membran verankert wird, wobei der N-Terminus extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär sitzt (Abb. 2.5 A) (Mohammadi et al., 2005). Dann folgen drei Immunglobulin (Ig)-ähnliche Schleifen (Ig I-III), die durch kurze Linkersequenzen voneinander getrennt sind. In der Linkersequenz zwischen Ig I und Ig II befindet sich bei den meisten Triploblasten eine „saure Box“ (Rebscher et al., 2009). Hierbei handelt es sich um eine Abfolge saurer Aminosäuren, deren Funktion noch nicht geklärt ist (Rebscher et al., 2009). In der zweiten Schleife ist zudem eine Bindestelle für Heparin codiert (Abb. 2.5 A) (Mohammadi et al., 2005). Die Ig-ähnlichen Schleifen werden, mit Ausnahme von *Hydra* (Sudhop et al., 2004), über Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinen gebildet (Mohammadi et al., 2005; Rebscher et al., 2009). Die Transmembran-Domäne, die den Rezeptor in der Membran verankert, besteht aus einer einzelnen Helix. Intrazellulär besitzen die Rezeptoren für die Signalweiterleitung eine zweigeteilte, hoch konservierte Tyrosinkinase-Domäne (Abb. 2.5 A). Innerhalb der intrazellulären Domäne und z.T. in der Tyrosinkinase-Domäne befinden sich 6 Tyrosinreste, die phosphoryliert werden können, wodurch eine Signalweiterleitung möglich wird (Abb. 2.5 A) (Mohammadi et al., 2005; Rebscher et al., 2009; Ornitz und Itoh, 2015). Des Weiteren sind auch SH₂ und SH₃ (*Src-homology 2/3*) Bindestellen vorhanden, über die z.B. Phospholipase C (PLC γ) binden kann (Abb. 2.5 A) (Mohammadi et al., 1991).

Durch alternatives Spleißen der Transkripte eines FGFR Gens kann sowohl die Zahl der Ig-ähnlichen Schleifen (meist fehlt dann Ig I) als auch die Anzahl der Domänen verändert werden (Johnson und Williams, 1993; Powers et al., 2000). Johnson et al. entdeckten 1990 eine Isoforme vom FGFR1 der Vertebraten, die nur aus der extrazellulären Domäne und nur aus zwei Ig-ähnliche Schleifen bestand (Abb. 2.5 B). Diese wird sekretiert und ist in der Lage FGFs zu binden, was vermuten lässt, dass sie, da sie kein Signal in die Zelle weiterleiten kann, als Negativ-Regulator für den FGF/FGFR Signalwege dient, indem sie freie FGFs bindet. Des Weiteren gibt es auch Varianten von humanen FGFR1, bei denen, nach der Verankerung in der Membran, die extrazelluläre Domäne proteolytisch abgeschnitten wird (Hanneken, 2001).

Bei Invertebraten variiert die Zahl der Ig-ähnlichen Schleifen von vornherein. So besitzen Breathless und Tc-FGFR fünf dieser Schleifen, während Heartless nur zwei hat (Shishido et al., 1993; Sharma et al., 2015). EGL-15 besitzt dagegen die für FGF-Rezeptoren typischen drei Schleifen (Goodman et al., 2003). Auch bei Invertebraten kann die Zahl an FGF-Rezeptoren durch alternatives Spleißen erhöht werden. So sind für EGL-15 und Tc-FGFR zwei Isoformen bekannt (Goodman et al., 2003; Sharma et al., 2015).

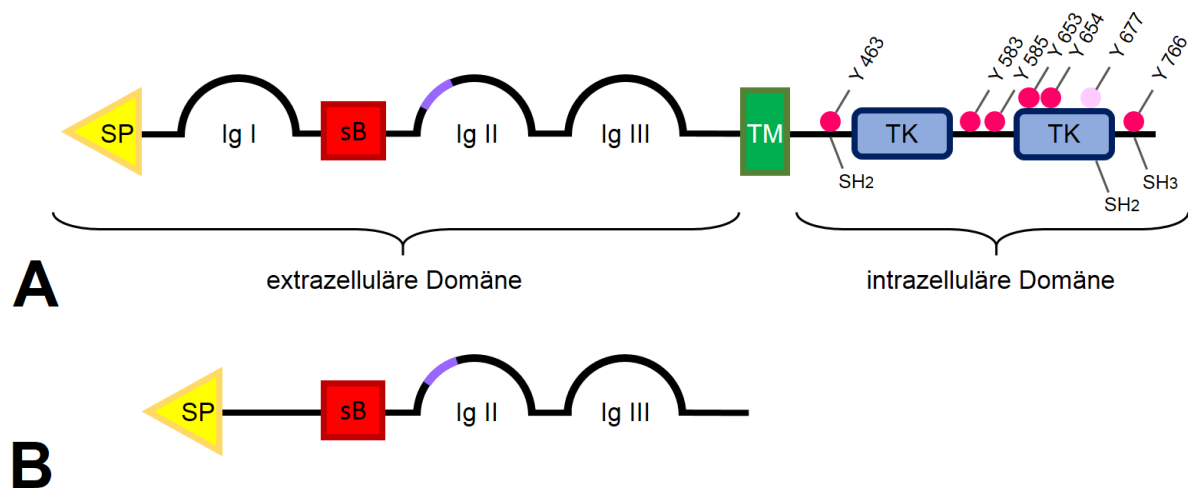


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Vertebraten FGF-Rezeptoren 1-4 und einer Isoform vom humanen FGFR1.

(A) Allgemeine Struktur der FGF-Rezeptoren 1-4 der Vertebraten. (B) Eine alternative Spleißvariante des humanen FGFR1, nach Johnson et al., 1990. SP: Signalpeptid, sB: saure Box, Ig I-III: Immunglobulin-ähnliche Schleifen 1-3, TM: Transmembran-Domäne, TK: Tyrosinkinase-Domäne, Y: Tyrosin, lila: Heparinbindestelle, dunkel rosa: phosphorylierte Tyrosine bei Rezeptoraktivierung, blas rosa: zusätzliche Phosphorylierungsstelle für STAT3 (*Signal transducers and activators of transcription-3*) 463-766: phosphorylierte Tyrosinreste von hsFGFR1 (NP_075598.02).

[erstellt nach: Ornitz und Itoh, 2015]

2. 1. 3 Die Bindung zwischen FGF und FGFR und nachgeschaltete Signalkaskaden

Die Bindung eines FGFs an seinen Rezeptor wird über die *Core*-Region der FGFs vermittelt und um die Bindung zu stabilisieren, werden zudem HS/HSPG als Kofaktoren benötigt (Schlessinger et al., 2000, Ibrahimi et al., 2005). Für die Bindung der Liganden sind die membrannahen Schleifen Ig II und Ig III nötig, wobei die Spezifität für die verschiedenen Liganden über Ig III vermittelt wird. Die Affinität von Ig III zu den einzelnen FGFs wird dabei durch alternatives Spleißen des Transkripts von Ig III variiert (Powers et al., 2000; Holzmann et al. 2011). Die Bindung von HS oder HSPGs wird wiederum über Ig II geregelt. Ig I ist nicht an der Ligandenbindung beteiligt, sondern dient möglicherweise der Autoinhibition der

Ligandenbindung. Ig I kann sich zu Ig II und Ig III rückfalten und blockiert so die Bindestelle, vermittelt wird diese Faltung über die „saure Box“ (Olsen et al., 2003; Xu et al., 1992). Das heißt also, ein FGF bindet zusammen mit einem HSPG über die *Core*-Region im Bereich von Ig II und Ig III an seinen Rezeptor. Es entsteht ein 1:1:1 FGF:HSPG:FGFR Komplex (Abb. 2.6 A). Die Bildung dieses Komplexes führt zu einer Konformationsänderung und stabilisiert so die Entstehung von Homodimeren, 2:2:2 FGF:HSPG:FGFR (Abb. 2.6 B) (Beenken und Mohammadi, 2009; Ornitz und Itoh, 2015). Diese Dimerisierung führt wiederum zu einer wechselseitigen Transphosphorylierung bestimmter Tyrosinreste innerhalb der intrazellulären Domäne und der Tyrosinkinase-Domäne (Furdui et al., 2006). Dabei entstehen Bindestellen für *docking* Proteine, wie FRS2 (FGF receptor substrate 2, vertebratenspezifisch) (Gotoh et al., 2008) oder Dof (downstream of FGFR, bei *D. melanogaster*) (Vincent et al., 1998). Die Bindung der *docking* Proteine ermöglicht die Bindung weiterer Adapterproteine, wie Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) oder SOS (Son of sevenless) (Eswarakkumar et al., 2005). Diese aktivieren nachfolgend beispielsweise die Tyrosinphosphatase Shp2 oder *downstream* Signalwege wie den Ras/MAP (mitogen-activated protein)-Kinase Signalweg oder den PI3 (phosphatidylinositol 1,4,5,-trisphosphat)-Kinase Signalweg (Ong et al., 2001; Eswarakkumar et al., 2005; Gotoh et al., 2008). Eine direkte Aktivierung eines intrazellulären Signalweges über FGF-FGFR Bindung ist nur in Fall von PLC γ (Phospholipase C γ) möglich (Mohammadi et al., 1991). Dies führt über IP₃ (Inositoltrisphosphat) zur Freisetzung von Calciumionen und über DAG (Diacylglycerol) zur Aktivierung von PKC, deren Zielgene wiederum an Prozessen, wie Proliferation oder Differenzierung beteiligt sind (Thisse und Thisse, 2005).

Rudolf et al. (2013) konnten zeigen, dass FGF-Rezeptoren teilweise sogar funktional über, seit Millionen Jahren getrennte, Tierstämme hinweg konserviert sind. Es gelang Rudolf et al. mittels *Hydra* FGFRa bei einer *Drosophila* Heartless Null-Mutante den frühen Phänotyp der Wanderung mesodermaler Zellen partiell zu retten.

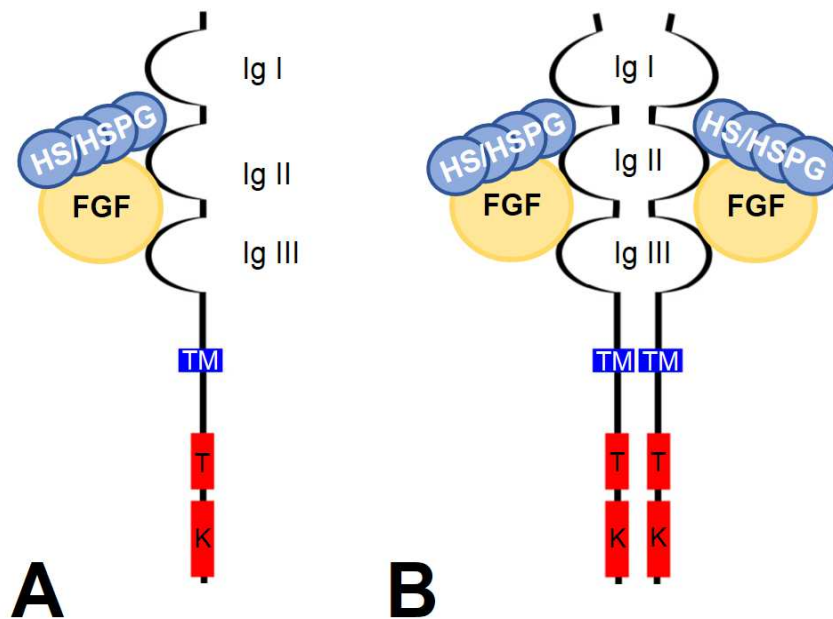


Abbildung 2.6: FGF Ligand-Rezeptor-Komplex.

(A) Monomerer Komplex aus FGF, HS/HSPG und FGFR. (B) Homodimer aus FGF, HS/HSPG und FGFR.

FGF: Ligand, FGFR: Rezeptor, HS: Heparansulfat, HSPG: Heparansulfatproteoglykan, Ig I-III: Immunglobulin-ähnliche Schleife 1-3, TM: Transmembran-Domäne, TK: Tyrosinkinase-Domäne.

[erstellt nach: Beenken und Mohammadi, 2009; Ornitz und Itoh, 2015]

2. 1. 4 Evolution von FGFs und FGF-Rezeptoren

Sequenz- und Strukturuntersuchungen haben gezeigt, dass FGFs und FGF-Rezeptoren nur bei Eumetazoa vorhanden sind (Coulier et al., 1997; Bertrand et al., 2013). Nach derzeitigem Wissensstand fehlt der Signalweg bei Parazoa, wie den Porifera und Choanoflagellaten, den Schwestergruppen der Eumetazoa. Der FGF/FGFR Signalweg ist somit wahrscheinlich erst mit der Entstehung der Eumetazoa entstanden (Rebscher et al., 2009, Bertrand et al., 2013; Oulion et al., 2012).

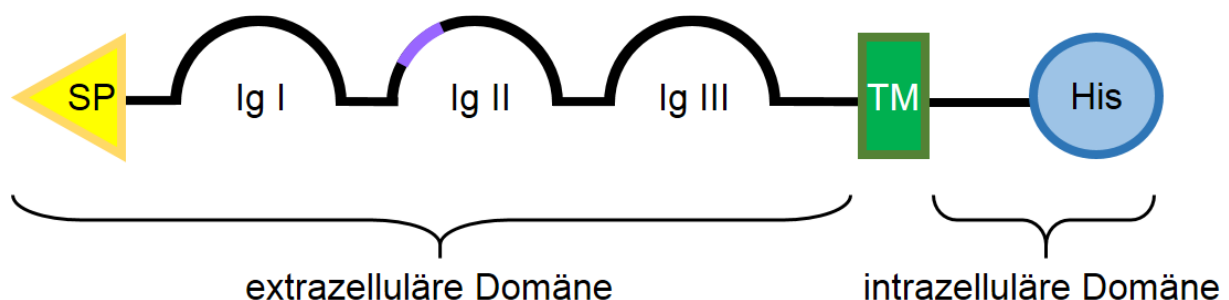
Zur Entstehung der heutigen Zahl und Unterfamilien der FGFs gibt es verschiedene Hypothesen. Es wird vermutet, dass die Familie der FGFs durch zwei Phasen von Genduplikation entstanden ist. Die erste Phase fand vor mehr als 600 Millionen Jahren statt und lag damit vor der Aufspaltung in Proto- und Deuterostomia. Die zweite Duplikation trat mit Entstehung der Vertebraten auf, die eine doppelte Genomduplikation durchliefen (Itoh und Ornitz, 2004; Popovici et al., 2005; Oulion et al., 2012). Während der ersten Phase wurden dabei aus ein bis drei archeo-FGFs bis zu acht proto-FGFs (Itoh und Ornitz, 2004; Popovici et al., 2005; Oulion et al., 2012). Die zweite Phase der Duplikation, einhergehend mit Verlustereignissen, führte dann zu den heutigen, bei Vertebraten vorhandenen, Unterfamilien mit ihren zwei bis vier Mitgliedern (Popovici et al., 2005). Oulion et al. (2012) schließen auch den umgekehrten Weg von vielen zu wenigen FGFs nicht aus. Sie favorisieren aber ebenfalls das Szenario, dass aus wenigen FGFs viele FGFs entstanden sind. Zu den evolutiv ältesten

Familien zählen, nach Oulion et al. (2012), die Unterfamilien 1/2 und 8/17/18/24. FGFs, dieser Familien, kommen auch bei Cnidaria, wie *N. vectensis*, vor. 2011 postulierten Itoh und Ornitz, dass ein Vorläufer der intrakrinen FGFs (FGFs 11-14) der ursprünglichste ist und alle anderen FGFs bzw. die Unterfamilien aus ihm hervorgegangen sind.

Im Falle der Evolution der FGF-Rezeptoren wird davon ausgegangen, dass es einen ursprünglichen FGFR gab. Aus diesem sind dann wahrscheinlich unabhängig voneinander, durch linienspezifische Duplikationen, die ein bis zwei Rezeptoren der Invertebraten hervorgegangen. Die vier FGF-Rezeptoren der Wirbeltiere, entstanden während einer zweiten Phase der Vertebraten-Genexpansion (Coulier et al., 1997).

2. 1. 5 FGF-Rezeptor Like1 (FGFRL1), ein fünftes Mitglied der FGFR Familie

Im Jahr 2000 entdeckten zwei Arbeitsgruppen zeitgleich im menschlichen Knorpel bzw. in der Bauchspeicheldrüse ein möglicherweise fünftes Mitglied der FGFR Familie: FGFRL1(FGFR5) (Wiedemann und Trueb, 2000; Kim et al., 2001). Beide Forschergruppen konnten zeigen, dass FGFRL1 ein Signalpeptid, die typischen drei Ig-ähnliche Schleifen, die über Cysteine gebildet werden, und eine Transmembrandomäne besitzt (Abb. 2.7). Intrazellulär codiert die Sequenz, statt einer Tyrosinkinase-Domäne, eine Histidin-reiche Region mit noch unbekannter Funktion (Abb. 2.7) (Trueb 2011). Sleeman et al. (2001) identifizierten zwei alternative Spleißvarianten, FGFR5 β mit drei Ig-ähnliche Schleifen und FGFR5 γ mit zwei Ig-ähnliche Schleifen. Beide Formen haben eine Transmembrandomäne und intrazellulär eine Histidin-reiche Region. Des Weiteren konnten Sleeman et al. (2001) und auch nachfolgende Studien zeigen, dass FGFRL1 auch in weiteren menschlichen Geweben, wie Leber, Niere, Herz und Lunge und auch in der Skelettmuskulatur vorhanden ist (Trueb, 2011). Zudem besitzt FGFRL1, wie auch die FGF-Rezeptoren 1-4, zu Beginn der zweiten Ig-ähnlichen Schleife eine Heparinbindestelle (Abb. 2.7) und scheint Heparin/HS/HSPG sogar mit höherer Affinität zu binden als FGFR1-4 (Trueb et al., 2003; Rieckmann et al., 2008).



▲ Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Struktur von FGRL1 der Vertebraten.

SP: Signalpeptid, Ig I-III: Immunglobulin-ähnliche Schleifen 1-3, TM: Transmembran-Domäne, His: intrazelluläre Histidin-reiche Region, lila: Heparinbindestelle.

2. 1. 5. 1 FGRL1 im Tierreich

FGRL1 wurde nicht nur beim Menschen, sondern 2002 auch *Dugesia japonica*, (dort Noudarake (NDK) genannt), entdeckt (Cebria et al., 2002) und unterscheidet sich nur leicht vom humanen FGRL1. NDK besitzt nur die beiden membrannahen Ig-ähnliche Schleifen II und III. Die Transmembran-Domäne, zur Verankerung in der Membran, ist auch vorhanden; jedoch die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne, so wie auch die Histidin-reiche Region, fehlt. Wie die FGF-Rezeptoren ist FGRL1 im gesamten Tierreich bis hin zu basalen Organismen wie *N. vectensis* zu finden (Hayashi et al., 2004; Trueb et al., 2005; Bertrand et al., 2009). Wie die klassischen FGF-Rezeptoren kann auch bei FGRL1 die extrazelluläre Domäne proteolytisch abgespalten werden (Steinberg et al., 2010a).

2. 1. 5. 2 Wirbeltier FGRL1 ist in der Lage FGFs zu binden und agiert möglicherweise als negativer Regulator des FGF/FGFR-Signalweges

Aufgrund der Strukturähnlichkeit von FGRL1 mit den FGF-Rezeptoren 1-4 und den Fehlen der Tyrosinkinase (Wiedemann und Trueb, 2000, Kim et al., 2001; Sleeman et al., 2001) wird FGRL1 als negativer Regulator für den FGF/FGFR Signalweg in Betracht gezogen. Das FGRL1 in der Lage ist, wie die FGF-Rezeptoren 1-4, FGFs zu binden, konnten Steinberg et al. (2010a) sowohl mittels Bindungssassay, als auch mittels Dot-Blot, zeigen (Abb. 2.8). Des Weiteren bildet er unter Beteiligung von HSPGs und beispielsweise FGF2, ausschließlich Homodimere aus (Rieckmann et al., 2008).

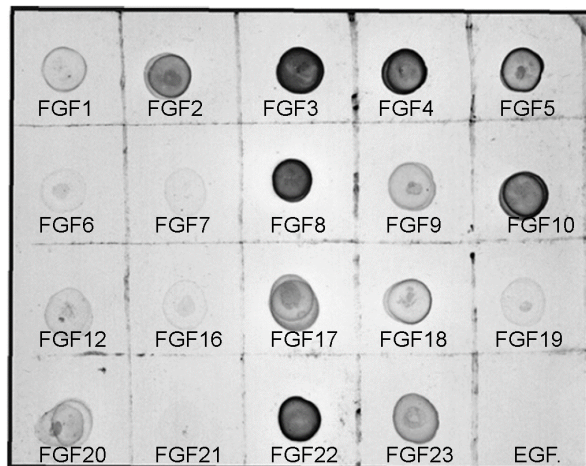


Abbildung 2.8: FGFR1 bindet FGF mit unterschiedlicher Affinität. Liganden Dot Blot zeigt eine hohe Affinität von FGFR1 zu FGF2, 3, 4, 8, 10 und 22. EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor (Negativkontrolle), geblottet wurden 200 ng des jeweiligen FGFs.

[verändert nach: Steinberg et al., 2010a]

Dass es sich bei FGFR1 um einen „Gegenspieler“ zum FGF/FGFR Signalweg handelt, konnten Steinberg et al. (2010a) für *Xenopus* zeigen. Eine ektopische Überexpression von FGFR1 in *Xenopus* führte zu dem gleichen Phänotyp (gestörte Ausbildung der anterior-posterior Achse), wie die Überexpression des verkürzten *Xenopus* FGFR (XFD, Amaya et al., 1993). Sowohl der durch eine ektopische Überexpression von FGFR1, als auch der durch XFD entstandene Phänotyp konnte mittels Injektion von FGFR1 gerettet werden. Als ein weiteres Indiz für die Beteiligung von FGFR1 am FGF/FGFR Signalweg gilt, neben der Ähnlichkeit des Expressionsmusters zu dem von FGFR1 während der Entwicklung der Mausniere (Amann und Trüb, 2013), auch die Ko-Expression mit FGF8 bei der *Xenopus*-Entwicklung (Hayashi et al., 2004). Zudem konnten Trüb et al. (2003) zeigen, dass eine Überexpression von FGFR1 einen negativen Effekt auf die DNA Synthese und Proliferation von Zellen hat, was die Autoren als Hinweis für eine mögliche Funktion von FGFR1 als „Gegenspieler“ des FGF/FGFR Signalweges werten.

2. 1. 5. 3 Funktionen von FGFR1

FGFR1 ist, wie die FGFs und die FGF-Rezeptoren 1-4, auch während der Embryonalentwicklung, zum Beispiel von Maus (Trüb et al., 2003) und Frosch (Steinberg et al., 2010a), wichtig. FGFR1 ist möglicherweise, ähnlich wie FGF8, für die Etablierung von Grenzen nötig, denn Cebria et al. (2002) konnten zeigen, dass ein *knockout* von NDK die Grenzen des Vorderhirns zerstört und sich ektopische Hirnstrukturen in der posterioren Schwanzregion der Plattwürmer bilden. Des Weiteren ist FGFR1 auch an der Entstehung der Niere (Gerber et al., 2009) und des Zwerchfells sowie dessen Muskelfasern beteiligt (Baertschi

et al., 2007; Amann et al., 2014). Rieckmann et al. (2008) konnten eine Akkumulation von FGFR1 beim Kontakt zweier Zellen feststellen. Hierbei scheint der FGFR1 der einen Zelle ein HSPG der anderen Zellen zu binden und so die Zelladhäsion zu fördern. Steinberg et al. (2010b) konnten nachweisen, dass FGFR1 in verschiedenen Zelllinien die Fusion der einzelnen Zellen zu einem Synzytium fördert.

Die Funktion der intrazellulären Domäne von FGFR1 bei Wirbeltieren (und Planarien) ist noch immer unbekannt. Bluteau et al. (2014) zeigte, dass die intrazelluläre Domäne für die Organogenese der Maus keine entscheidende Rolle spielt und weder die Lebensspanne, noch den Phänotyp, verändert. Sie vermuten, dass die entscheidenden Funktionen von der extrazellulären Domäne ausgehen.

2. 2 *Hydra* ein basaler Modellorganismus zur Untersuchung entwicklungsbiologischer Prozesse

Bei *Hydra* handelt es sich um einen basalen Organismus, der sich aufgrund seines einfachen Körperbaus und des hohen Regenerationsvermögens gut zur Untersuchung entwicklungsrelevanter Prozesse und der evolutiven Nachverfolgung dieser Prozesse eignet. In den Laboren werden am häufigsten *Hydra vulgaris* Zürich, *Hydra vulgaris* Basel und *Hydra vulgaris* AEP gehalten (Hemrich et al., 2007; Martinez et al., 2010). *Hydra vulgaris* AEP pflanzt sich als einzige erfolgreich sexuell fort, und ist geeignet um transgene Tiere für funktionelle Analysen herzustellen (Wittlieb et al., 2006). Die Verwandtschaftsbeziehungen wurden zwar phylogenetisch analysiert, aber ob es sich bei *Hydra vulgaris* Basel, *Hydra vulgaris* Zürich und *Hydra vulgaris* AEP um Arten oder Linien handelt ist nicht ganz geklärt (Hemrich et al., 2007; Martinez et al., 2010).

2. 2. 1 *Hydra* - Ein Süßwasserpolytyp mit einfachem Körperbau

Bei *Hydra* handelt es sich um einen Süßwasserpolytypen, der zum Stamm der *Cnidaria* (Nesseltiere) und zur Klasse der Hydrozoa gehört. *Hydra* weist einen einfachen diploblastischen und radiärsymmetrischen Körperbau, mit lediglich einer oral-aboral verlaufenden Körperachse, auf. Diese Achse unterteilt sich in Kopf (oral), Rumpf und Fuß (aboral) (Abb. 2.9 A). In der Mitte des Kopfes, als kleine kegelförmige Erhöhung, befindet sich das Hypostom mit der Mundöffnung. Das Hypostom ist von einem Kranz aus Tentakeln (zwischen 4 und 6) umgeben (Abb. 2.9 A). Die Tentakel sind mit Nematocysten (Nesselkapseln) besetzt und dienen dem Beutefang. Der Rumpf bzw. die Körpersäule

unterteilt sich in die Gastralregion und die Knospungszone (Abb. 2.9 A). Der Gastralraum, der von der Gastralregion umschlossen wird, ist, wie für Hydrozoa typisch, ungekammert. Hier findet die extrazelluläre Verdauung statt. Unterhalb der Gastralregion schließt sich die Knospungszone an (Abb. 2.9 A). Dies ist der Bereich, in dem sich eine neue Knospe bildet und somit die asexuelle Vermehrung stattfindet. Nach der Knospungszone folgt der Stiel mit dem Fuß (Basalscheibe). Der Stiel ist leicht von der Knospungszone abgesetzt. Daran schließt sich die Basalscheibe, die aus großen Schleim sezernierenden Zellen besteht, an (Abb. 2.9 A). Der Schleim dient zum Anheften am Substrat. In der Mitte der Basalscheibe befindet sich eine kleine Pore, die eine Verbindung zwischen äußerer Umwelt und Körperinnerem darstellt (Shimizu et al. 2007). Ihre Funktion ist jedoch noch unbekannt.

Des Weiteren besitzt *Hydra* entlang der oral-aboralen Achse sechs morphologische Grenzen, die je nach Knospenstadium auch in der Knospe zu finden sind (Abb. 2.9 B) (Böttger und Hassel, 2012). Die erste befindet sich an der Spitze des Hypostoms, die Mundöffnung (Abb. 2.9 B: I). Hier haben ekto- und entodermale Zellen apikal direkten Kontakt zueinander. Die zweite Grenze ist die Grenze zwischen dem Hypostom und den Tentakeln (Abb. 2.9 B: II). Die nächste Grenze ist innerhalb der Tentakelzone, zwischen auswachsendem Tentakel und Tentakelzone (Abb. 2.9 B: IIIa) (Bode, 1996). Eine weitere Grenze besteht zwischen Tentakelzone und Körpersäule (Abb. 2.9 B: IIIb) (Böttger und Hassel, 2012). Die vierte Grenze trennt die Körpersäule vom Stiel (Abb. 2.9 B: IV). Die fünfte grenzt die Basalscheibe vom Stiel ab (Abb. 2.9 B: V). Die sechste Grenze ist im Gegensatz zu den anderen nicht dauerhaft vorhanden. Sie findet sich nur bei knospenden Tieren. Es handelt sich um die Trennlinie zwischen Elterntier und Knospe (Abb. 2.9 B: VI) (Böttger und Hassel, 2012).

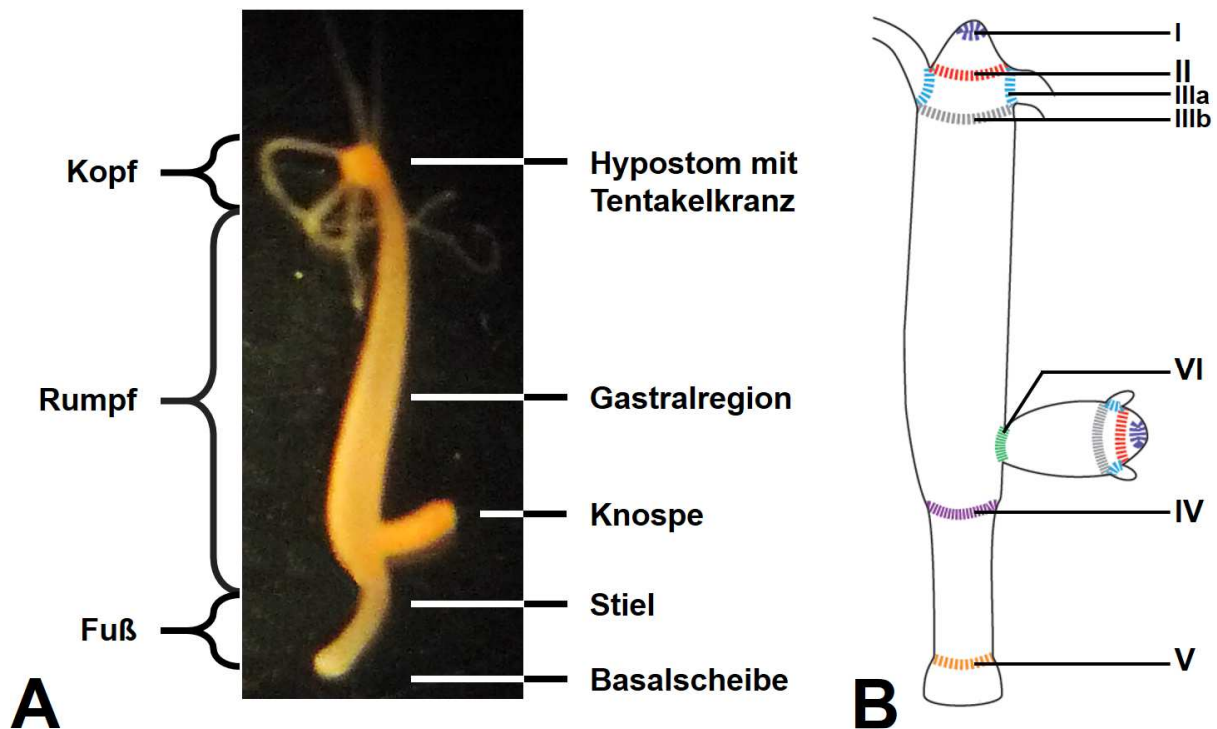


Abbildung 2.9: Morphologie von *Hydra*.

(A) Anatomie eines sich asexuell fortpflanzenden Polyps von *Hydra vulgaris* AEP. (B) Morphologische Grenzen von *Hydra*. I: Hypostomspitze, Ekto- und Entoderm im direkten Kontakt, II: Grenze zwischen Hypostom und Tentakel/Tentakelzone, IIIa: Grenze zwischen Tentakel und Tentakelzone, IIIb: Grenze zwischen Tentakelzone und Körpersäule, IV: Grenze zwischen Körpersäule und Stiel, V: Grenze zwischen Stiel und Basalscheibe, VI: Grenze zwischen Elterntier und Knospe.

[B verändert nach: Böttger und Hassel, 2012]

Wie alle diploblastischen Organismen besitzt *Hydra* nur zwei Zellschichten, Ekto- und Entoderm. Das Ektoderm stellt die äußere Zellschicht dar und ist von einer Schutzschicht, der Glycokalyx, umgeben, welche den Polypen vor schädlichen Einflüssen aus der Umwelt schützt. Die innere Zellschicht, das Entoderm, auch Gastrodermis genannt, umschließt den Gastralraum. Zudem besitzt *Hydra* ein netzartiges Nervensystem, das aus Ganglienzellen (Abb. 2.11 B) und sensorischen Zellen (Abb. 2.11 B) besteht (Burnett und Diehl, 1964; Koizumi, 2002). Während die Ganglienzellen an der Basis der Epithelzellen sitzen (Abb. 2.10 A) und *Hydra* netzartig durchziehen (Abb. 2.10 B: I), reichen die sensorischen Zellen mit ihrem Zellkörper bis zur apikalen Seite der Epithelzellen (Abb. 2.10 A) und befinden sich hauptsächlich im Hypostom, den Tentakeln und der Basalscheibe (Abb. 2.10 B: II) (Koizumi, 2002).

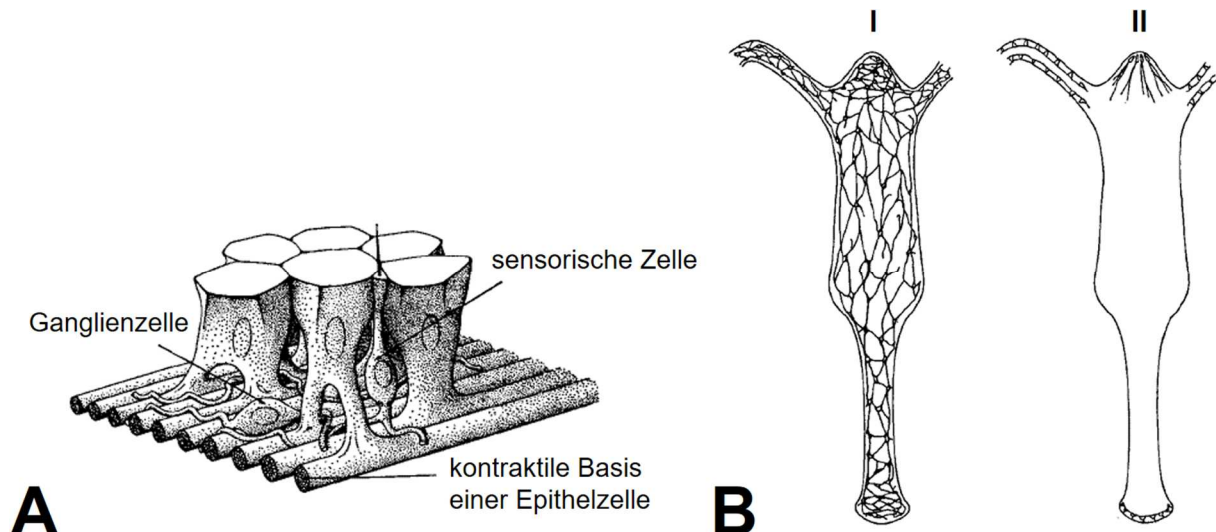


Abbildung 2.10: Aufbau des Nervensystems von *Hydra*.

(A) Lokalisation von Ganglienzellen und sensorischen Zellen im Ektoderm. (B) Verteilung von Ganglienzellen und sensorischen Zellen in *Hydra*, I: Ganglienzellen, II: sensorische Zellen.

[erstellt nach: Mackie and Passano 1968; Koizumi, 2002]

Insgesamt besitzt *Hydra vulgaris* 20 Zelltypen, die aus drei Stammzelllinien hervorgehen (Hobmayer et al. 2012). Die ersten beiden Linien liefern die ekto- und entodermalen Epithelmuskelzellen. Aus ihnen gehen zeitlebens die jeweiligen Epithelmuskelzellen (Epithelmuskelzellen) hervor, die die beiden Zellschichten bilden. Je nach Position entlang der Körpersäule können die Zellen morphologische Unterschiede aufweisen. So sind besonders die ektodermalen Epithelmuskelzellen der Tentakel sehr groß (Abb. 2.11 A). Hierbei handelt es sich um sogenannte Batteriezellen, in die sich die verschiedenen Nematocyten (Nesselzellen) mit ihren Nematocysten (Nesselkapseln) einlagern, indem sie sich in Membraneinstülpungen platzieren, aus denen die Kapseln bei Futterkontakt abgeschossen werden. Die Umwandlung in Batteriezellen erfolgt durch die Transdifferenzierung der Epithelmuskelzellen an der Basis der Tentakel. Im Bereich des Hypostoms und der Basalscheibe sind die ekto- und entodermalen Epithelmuskelzellen z.T. sehr lang gestreckt (Abb. 2.11 A) (Hobmayer et al. 2012).

Die dritte Stammzelllinie sind die interstitiellen Stammzellen (I-Zellen). Hierbei handelt es sich um multipotente Stammzellen, die ebenfalls zeitlebens erhalten bleiben. Aus ihnen gehen z.B. sensorische Zellen und Ganglienzellen hervor (Abb. 2.11 B). Weiterhin können sich I-Zellen zu entodermalen Drüsenzellen differenzieren (Abb. 2.11 B), welche Verdauungssekrete in den Gastralraum abgeben. Sie liefern auch Nematoblasten, die Vorläufer für die Cnidaria typischen Nematocyten mit ihren Nematocysten (Abb. 2.11 B). Diese sind, durch das in ihnen

enthaltende Nesselgift, wichtig für den Beutefang und zur Verteidigung. Des Weiteren entwickeln sich aus den I-Zellen sowohl männliche als auch weibliche Geschlechtszellen (Abb. 2.11 B). Als letztes können sich I-Zellen auch zu schleimproduzierenden Drüsenzellen der Basalscheibe differenzieren (Abb. 2.11 B) (Hobmayer et al. 2012).

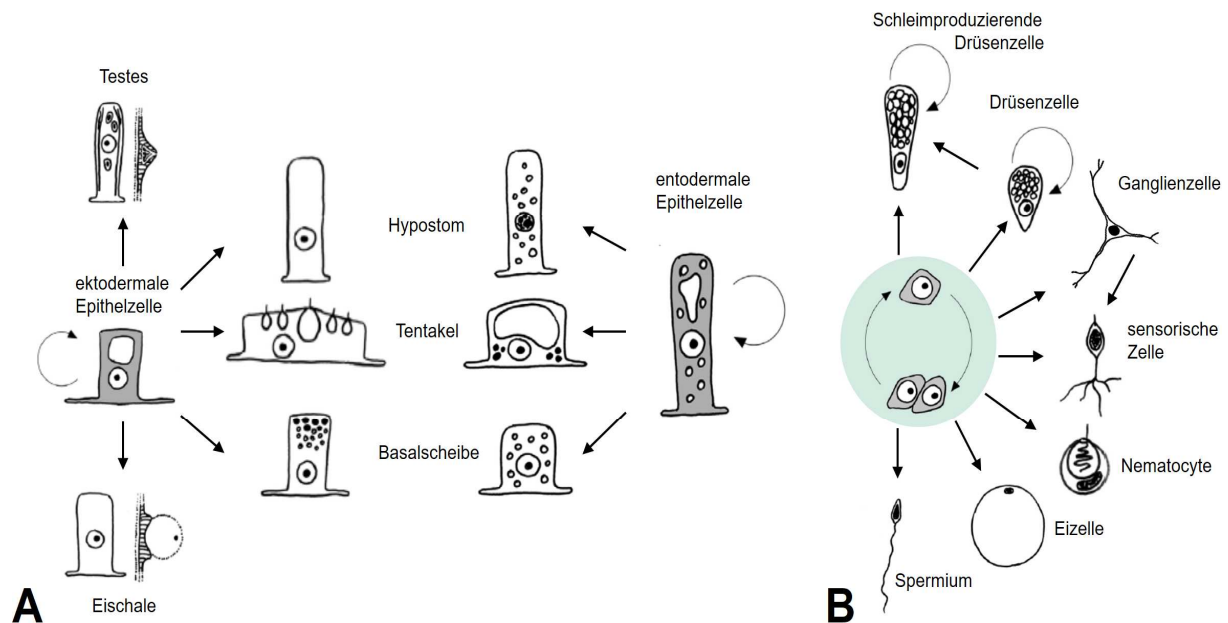


Abbildung 2.11: Zelldifferenzierung und Zellmorphologie der Zelllinien bei *Hydra*.

(A) Differenzierung und Morphologie von ekto- und entodermalen Epithelzellen. (B) Differenzierung und Morphologie von I-Zellen und ihren Derivaten.

[verändert nach: Hobmayer et al., 2012; Burnett und Diehl, 1964]

Zwischen den beiden Zellschichten befindet sich die Mesogloea². Hierbei handelt es sich um eine zellfreie Schicht, die sowohl von ento- als auch von ektodermalen Epithelmuskelzellen sekretiert wird (Sarras, 2012). Sie ist von Poren durchzogen, die dadurch entstehen, dass die Epithelmuskelzellen ihre Fortsätze in der Mesogloea verankern. Über diese Poren können die ento- und ektodermalen Zellen mittels ihrer Fortsätze Zell-Zell-Kontakte herstellen (Abb. 2.12). Die Poren und die beiden subepithelialen Bereiche der Mesogloea, die mit den Epithelzellen in Kontakt stehen, bestehen hauptsächlich aus Laminin und Kollagen Typ IV (Abb. 2.12). Dazwischen befindet sich die interstitielle Matrix, die hauptsächlich aus Kollagen vom Typ I besteht (Abb. 2.12) (Shimizu et al., 2009; Sarras, 2012). Weitere Bestandteile sind Fibronektin und Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) (Sarras et al., 1991). Die Mesogloea fungiert als Gerüst oder Stützschrift zur Aufrechterhaltung der Körperform. Zudem dient sie den Zellen

² entspricht der ECM bei höheren Lebewesen

als Verankerung und gleichzeitig als Möglichkeit sich auf ihr fortzubewegen (Aufschnaiter et al., 2011). Sie ist hoch elastisch und folgt den Kontraktionsbewegung der Epithelmuskelzellen bei Berührung, weshalb der Polyp auch in der Lage ist sich zusammen zu ziehen (Sarras und Deutzmann, 2001).

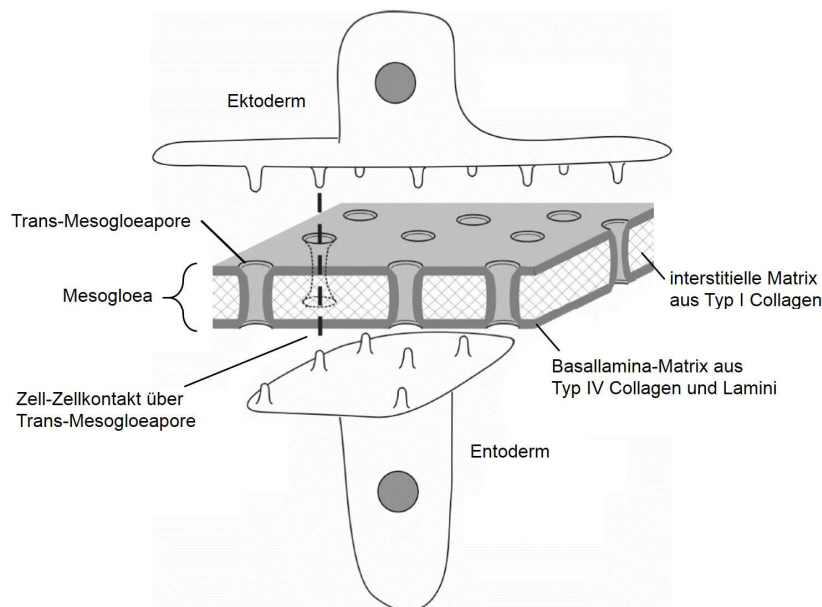


Abbildung 2.12:
Schematischer Aufbau und
Struktur der Mesogloea von
Hydra.
[verändert nach: Shimizu et al.,
2009]

2. 2. 2 Fortpflanzung bei *Hydra*

Die Fortpflanzung erfolgt abhängig von den Umweltbedingungen entweder sexuell oder asexuell, durch Knospung.

2. 2. 2. 1 Sexuelle Fortpflanzung bei *Hydra*

Bei der sexuellen Fortpflanzung bilden die männlichen Tiere, entlang der Körpersäule, mehrere mit Spermien gefüllte Testes aus (Abb. 2.13 A), während die Weibchen ein einzelnes Ei tragen (Abb. 2.13 B) (Martin et al., 1997). Bei den Testes von *Hydra* handelt es sich um eine Aussackung aus aufgefächerten, ektodermalen Epithelzellen, in der sich I-Zellen ansammeln und sich von proximal nach distal zu reifen Spermien entwickeln (Kuznetsov et al., 2001; Anton-Erxleben et al., 2008). Diese werden dann am distalen Ende der Testes über eine kleine Öffnung ins Wasser abgegeben (Kuznetsov et al., 2001; Nishimiya-Fujisawa und Kobayashi, 2012). Das Ei entwickelt sich ektodermal aus einer Ansammlung von I-Zellen (Miller et al.,

2000; Alexandrova et al., 2005). Zunächst differenzieren sich mehrere I-Zellen zu je einer Oozyte, die anderen I-Zellen werden zu sogenannten Ammenzellen. Letztlich bleibt eine Oozyte, die die anderen Zellen, durch Phagozytose aufgenommen hat, übrig (Miller et al., 2000; Alexandrova et al., 2005). Die Besamung des Eies erfolgt am Muttertier durch die ins Wasser abgegebenen Spermien. Innerhalb von zwei Wochen nach der Befruchtung schlüpft ein kleiner tentakelloser Polyp, der wenige Stunden später Tentakel ausgebildet hat (Martin et al., 1997). Welche Signalwege bei der Ausbildung der Testes oder des Eies und der Spermatogenese eine Rolle spielen ist noch nicht bekannt.

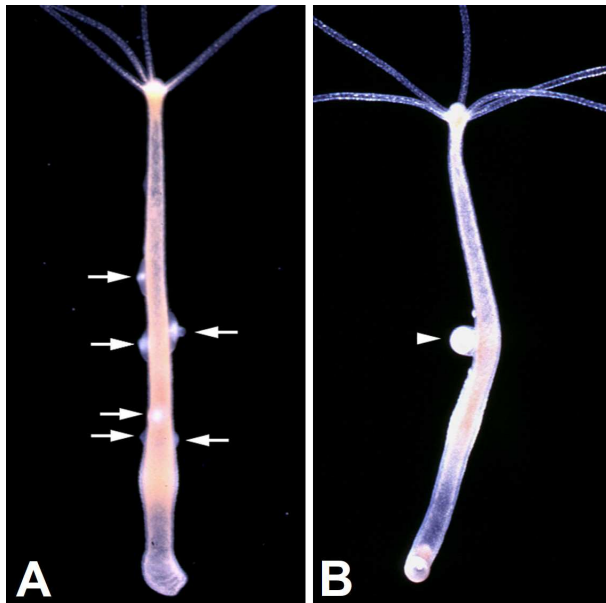


Abbildung 2.13: Männliche und Weibliche *Hydra vulgaris* AEP

(A) männliche *Hydra vulgaris* AEP; weiße Pfeile: Testes. (B) weibliche *Hydra vulgaris* AEP; weißer Pfeilkopf: Ei.

[verändert nach: Nishimiya-Fujisawa und Kobayashi, 2012]

2. 2. 2. 2 Asexuelle Fortpflanzung bei *Hydra*

Unter idealen Bedingungen, wie ausreichend Futter, sauberen Wasser, genügend Licht und einer Temperatur um 18 °C, pflanzt sich *Hydra* asexuell durch Knospung fort. Der Vorgang der Knospung lässt sich grob in drei Phasen und 10 Stadien unterteilen (Abb. 2.14) (Otto und Campbell 1977). Bei der ersten Phase handelt es sich um die Initiationsphase, sie umfasst die Stadien 1-3. Danach folgt die Elongationsphase, Stadium 4-7. Die Stadien 8-10 sind Teil der Ablösungsphase.

Die Initiation der Knospe im ersten Stadium beginnt mit einer lokalen Verdickung des Ektoderms (Abb. 2.14). Als nächstes ragt eine kleine Spitze des Entoderms in das verdickte Ektoderm (Stadium 2). Im dritten Stadium ist eine kleine dreieckige Ausstülpung beider Epithelien, mit der Mesogloea, in der Knospungszone zu erkennen (Abb. 2.14). Mit Erreichen

des vierten Stadiums beginnt die Elongationsphase, die Knospe verlängert sich (Abb. 2.14). Während sich im fünften Stadium die Knospe weiter verlängert hat, ist das sechste Stadium daran zu erkennen, dass die Knospe an einer Seite des distalen Endes beginnt Tentakelknospen auszubilden (Abb. 2.14). Im siebten Stadium haben sich die ersten Tentakelknospen verlängert und auf der gegenüberliegenden Seite sind weitere Tentakelknospen entstanden (Abb. 2.14). Im achten Stadium sind alle Tentakel etwa gleich lang und am proximalen Ende der Knospe (Knospenbasis) findet eine Konstriktion statt, die Ablösephase beginnt (Abb. 2.14). Im neunten Stadium bildet sich am Jungpolypen die Basalscheibe mit ihren großen schleimsekretierenden Zellen aus. Die Konstriktion hat sich weiter verengt (Abb. 2.14). Im letzten Stadium, Stadium 10, ist die Knospe vollständig entwickelt. Sie ist nur noch über eine kleine Gewebebrücke, bestehend aus ektodermalen Epithelzellen, mit dem Elterntier verbunden (Abb. 2.14). Der gesamte Vorgang der Knospung mit Ablösung dauert etwa vier Tage bei *Hydra vulgaris* AEP (eigene Beobachtungen).

Über die Signalwege, die bei der Knospung aktiv sind, ist nur wenig bekannt. Für Initiation der Knospe ist eine Kooperation zwischen kanonischen und nicht-kanonischen WNT Signalweg nötig (Philipp et al., 2009). Zudem spielt unter anderem HvWnt3 bei der Etablierung eines Kopfororganisators in der Knospenspitze eine wichtige Rolle. HvWnt8 und HvWnt5 sind bei der Evagination der Knospe und der Tentakel aktiv (Hobmayer et al., 2000; Philipp et al., 2009; Lengfeld et al., 2009). Zur Ausbildung einer Grenze zwischen Elterntier und Knospe scheint ein Zusammenspiel von FGF/FGFR-, WNT- und Notch-Signalweg nötig zu sein (Böttger und Hassel, 2012). Für die Ablösung der Knospe ist bekannt, dass FGFRa essentiell ist, welches bzw. ob es ein FGF gibt, was an FGFRa bindet ist nicht geklärt (Sudhop et al., 2004; Hasse et al., 2004).

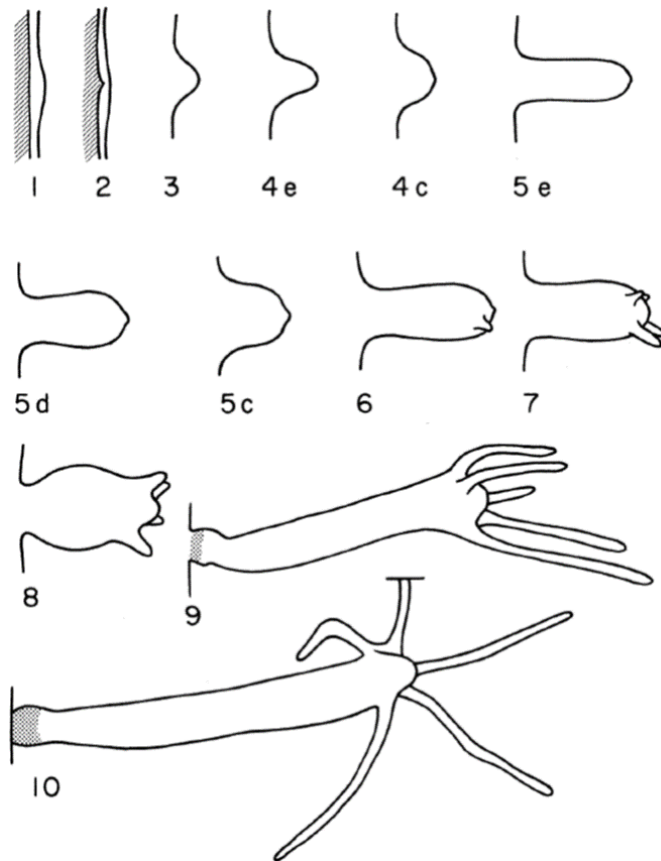


Abbildung 2.14: 10 morphologisch sichtbare Knospenstadien der Gattung *Hydra*.

Zahlen 1-10: Knospenstadien 1-10. Die Stadien 4 und 5 unterteilen sich nochmals in die Unterstadien e: elongierte Knospe, c: kontrahierte Knospe und d: flüssigkeits-gefüllte Knospe.

[Otto und Campbell, 1977]

2. 2. 3 Zell- und Gewebewanderung im adulten Tier und während der Knospung

In einer adulten *Hydra* ist das Gewebe ständig im Fluss. Es werden immer neue Zellen gebildet und alte Zellen gehen verloren. Die Epithelzellen entlang der Körpersäule durchlaufen ständig mitotische Teilungen. Der Zellzyklus dauert etwa drei Tage, so dass *Hydra* ihre Zellen in 3-4 Tagen verdoppelt (Campbell, 1967a; David und Campbell, 1972; Holstein et al., 1991). Dass eine *Hydra* sich in ihrer Größe nicht alle 4 Tage verdoppelt, liegt daran, dass etwa 80 % der überschüssigen Zellen für die Knospung verwendet werden. Der Rest wird in die Tentakel und Tentakelspitzen, das Hypostom und die Basalscheibe verschoben, um den Verlust verlorener Zellen auszugleichen (Campbell, 1967a).

Spricht man bei *Hydra* von Zell- und Gewebewanderung, muss zwischen aktiver und passiver Wanderung unterschieden werden. Große I-Zellen, die über die gesamte Körpersäule verteilt sind, wandern nicht (Boehm und Bosch, 2012). Ihre Derivate, wie Neuroblasten, Nematoblasten und Drüsenzellen, wandern individuell und aktiv entlang der Körpersäule (Campbell 1967b; Boehm und Bosch, 2012). Kleine I-Zellen und Nematoblasten wandern

ebenfalls aktiv, aber bleiben meist in Gruppen, aus 4-32 Zellen zusammen und wandern aus der Körpermitte z.B. in die Tentakel (Campbell, 1974). Sowohl die entodermalen, als auch die ektodermalen Epithelzellen wandern hingegen größtenteils nicht als einzelne Zellen aktiv, sondern werden als ganzes Gewebeblatt passiv verschoben (Campbell, 1974). Einzeln und aktiv wandern sie nur innerhalb der Tentakelzone und wenn sie als Batteriezellen in die Tentakel einwandern oder während der Knospung (Campbell, 1974).

Campbell (1967a) und Aufschnaiter et al. (2011) konnten zeigen, dass es unterhalb der Tentakel einen „stationären“ Bereich gibt, von dem das Gewebe nur langsam ins Hypostom wandert. Zudem gibt es einen Bereich innerhalb der Körpersäule, von dem aus das Gewebe bzw. die Zellen nur nach oral bzw. aboral wandern oder hin verschoben werden. Die genaue Position dieses Bereiches ist dabei vom Fütterungszustand des Tieres abhängig (Tripp, 1928). Oberhalb und unterhalb dieses Bereiches bewegt sich das Gewebe mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten in die einzelnen Körperregionen (Abb. 2.15). So benötigen die Epithelzellen unterhalb des Bereiches 2 Tage bis sie in eine neue Knospe eingewandert sind, während sie bis in die Fußscheibe 20 Tage brauchen (Abb. 2.15). Auch oberhalb des Bereiches wandern die Epithelzellen sehr langsam bis ins Hypostom (20 Tage), wogegen sie von der Tentakelbasis bis in die Tentakelspitzen nur 4 Tage benötigen (Abb. 2.15). Zudem wandern die ekto- und entodermale Epithelschicht Spezies-spezifisch unterschiedlich schnell (Campbell 1967b). Transplantationsexperimente (K. Adamkiewicz, BSc; AG Hassel) zeigten, dass das Ektoderm von *Hydra vulgaris* AEP sehr viel schneller wandert als das Entoderm. Keine Wanderung von Zellen kann aus dem Hypostom in aborale Richtung beobachtet werden (Campbell 1967a). Im Verlauf der Knospung wandern Zellen, nach Otto und Campbell (1977), in konzentrischen Kreisen in die Knospe ein. Die Einwanderung erfolgt sowohl von der oralen Seite, als auch der aboralen Seite des Muttertiers aus. Die Einwanderung der Zellen geschieht etwas bis Stadium 6, wobei zum Schluss nur noch Zellen von der aboralen Seite aus einwandern. Welche Signalwege hierbei eine Rolle spielen ist nicht geklärt.

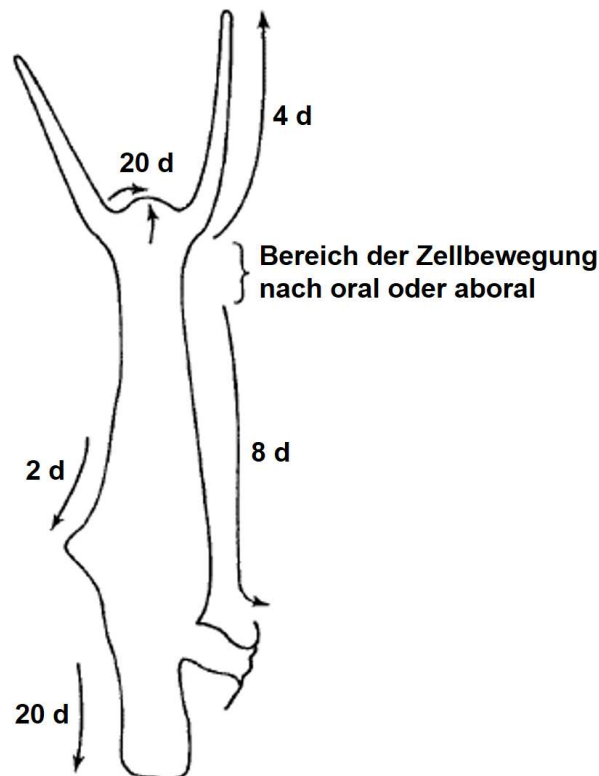


Abbildung 2.15: Zellbewegungen bei *Hydra*.
 d: Tage, Pfeile: Bewegungsrichtung der Zellen
 bzw. des Gewebes.

[verändert nach: Campbell 1967a]

2. 2. 4 Regeneration bei *Hydra*

Hydra behält zeitlebens ihre Stammzellen, was ihr ein sehr hohes Regenerationsvermögen verleiht. Das heißt, *Hydra* ist in der Lage verlorene Körperteile, wie Tentakel, zu regenerieren. Wird *Hydra* z.B. in zwei Hälften geteilt, so sind diese in der Lage die jeweils fehlende Struktur (Kopf oder Fuß) nachzubilden. Die Regeneration verläuft hierbei in drei Phasen. In der ersten Phase, die nach etwa einer Stunde abgeschlossen ist, findet die Wundheilung statt. Die geschieht mittels Umbildung von vorhandenen Gewebe (Morphallaxis). Es findet für circa 24 Stunden keine Zellproliferation statt (Li et al. 2015). In der zweiten Phase der Regeneration wird definiert, welcher Körperteil fehlt. Es bildet sich ein Organisator aus, der alle Entwicklungsprozesse anschaltet, durch die die fehlenden Strukturen in der dritten Phase neu ausgebildet werden (Holstein et al., 2003). Kopf- und Fußregeneration laufen dabei unterschiedlich schnell ab. Während die Fußregeneration bei 20 °C nach 24 h bis 30 h abgeschlossen ist, braucht die Kopfregeneration etwa 40 h (Mookerjee und Bhattacharjee, 1967). Verschiedene Regenerationsexperimente konnten zeigen, dass das Gewebe eine Polarität bzw. die Zellen eine Positionsinformation besitzen. Die Zellen „kennen“ ihre relative Position im Gewebe und sind deshalb in der Lage die richtigen, fehlenden Strukturen neu zu

bilden (Wilby und Webster, 1970; Wolpert, 1972). Neben dem Erkennen ihrer relativen Position im Tier, „wissen“ die Zellen auch, ob sie ento- oder ektodermal saßen (Hobmayer et al., 2001). Dissoziiert man Hydren in Einzelzellen, sodass eine Zellsuspension entsteht, sind die Zellen in der Lage sich wieder zusammenzufinden und ein Aggregat zu bilden. Abhängig von der Größe des Aggregates entstehen dann ein oder mehrere Tiere (Gierer et al., 1972).

2. 2. 5 Achsenbildung und Morphogenese bei *Hydra*

Vergleicht man die Genexpression achsenspezifisch transkribierter Gene entlang der oral-aboralen Achse zwischen *Hydra* und Bilateria, steht *Hydra* auf dem Kopf (Meinhard, 2002). Im Vergleich mit höheren Tieren, die eine anterior-posteriore Achse besitzen, verläuft die Abfolge solcher Gene bei *Hydra* umgekehrt. Gene, die bei Vertebraten spezifisch im posterioren Teil des Körpers (Rumpf und Schwanz) exprimiert werden, wie *wnt3* oder *brachyury*, werden bei *Hydra* im Kopf, dem Bereich zwischen Tentakeln und Hypostom, exprimiert. Im darunterliegenden aboralen Bereich werden Gene exprimiert, deren Transkripte sich bei Vertebraten spezifisch in Vorderhirn und Herz finden.

Wie bereits erwähnt besitzt *Hydra* sechs morphologische Grenzen (Abschnitt 2. 2. 1). Diese sind jedoch nicht nur morphologisch zu erkennen, sondern sie sind auch durch die Expression verschiedener Gene nachzuweisen. Beispielsweise werden an der Grenze zwischen Stiel und Basalscheibe die Gene *Shin-guard* und *Manacle* transkribiert und an der Grenze zwischen Elterntier und Knospe wird *FGFRa* (kringelchen), bei späten Knospenstadien, transkribiert (Abb. 2.16) (Sudhop et al., 2004; Böttger und Hassel, 2012). Diese genetischen Grenzen sind zum Teil sehr scharf. So ist es möglich, dass eine Zelle ein anderes Schicksal hat, als die Nachbarzelle. Das ist zum Beispiel beim Übergang einer ektodermalen Epithelzelle von der Tentakelzone in den Tentakel der Fall. Innerhalb der Tentakelzone sind alle Zellen noch epitheliale Stammzellen und in der Lage sich zu teilen (Holstein et al., 1991; Bode, 1996). Doch schon die erste Zelle des Tentakel, die noch keine Batteriezelle ist, ist dazu nicht mehr in der Lage und weist batteriezellspezifische Genexpression auf. Dieser Wechsel zwischen epithelialer Stammzelle und sich differenzierender Zelle vollzieht sich auch sehr schnell, innerhalb von 4-6 h. Dies ist etwa die Zeit, die eine epitheliale Stammzelle benötigt, um von der Tentakelzone in den Tentakel zu gelangen. Zudem scheint das Signal, welches den Wechsel vermittelt, sehr lokal zu wirken, so dass nur es zwischen benachbarten Zellen agiert (Holstein et al., 1991; Bode, 1996).

Auch die einzelnen Körperregionen lassen sich mittels Genexpression nachweisen; so wird zum Beispiel in der Knospungszone, kurz bevor sich eine Knospe ausbildet, *HyTcF* exprimiert.

Böttger und Hassel (2012) zeigen, dass *Hydra* trotz des einfachen Körperbaus, eine sehr komplexe Abfolge von Genexpressionen aufweist.

2. 2. 6 FGF/FGFR-Signalweg bei *Hydra*

Über den FGF/FGFR-Signalweg ist bei *Hydra* noch wenig bekannt. Ein Expressions-Screening einer *Hydra* cDNA Bank zeigte, dass ein FGFR (FGFRa: *kringelchen*) in *Hydra* vorhanden ist (Sudhop et al., 2004). Seine Struktur ist ähnlich denen der vier Vertebraten FGF-Rezeptoren. Er besteht aus drei Ig-ähnlichen Schleifen, einer Transmembrandomäne und einer zweigeteilten Tyrosinkinase-Domäne. In der Linkersequenz zwischen Schleife eins und zwei befindet sich eine Ansammlung saurer Aminosäuren. Im Gegensatz zu den FGF-Rezeptoren der Triploblasten werden nur die Schleifen eins und zwei über Cysteine gebildet. Die dritte Schleife wird über hydrophobe Aminosäuren gebildet. Phylogenetisch lässt er sich an der Basis der FGF-Rezeptoren einordnen (Rebscher et al., 2009). Das Transkriptionsmuster zeigt, dass *fgfra* während der Knospung hochreguliert wird. In frühen Stadien wird *fgfra* im Bereich des Hypostoms transkribiert (Abb. 2.16 A-H). Später befindet sich das Transkript als Ring rund um die Knospenbasis (Abb. 2.16 I-L). Zudem wird *fgfra* schwach im gesamten Tier ektodermal transkribiert (Sudhop et al., 2004). 2014 konnten Hasse et al. durch die Überexpression von *full-length* FGFRa und *truncated* FGFRa zeigen, dass FGFRa zum einen über den RAS/MEK/ERK Signalweg die Gewebetrennung und damit die Ablösung der Knospe steuert, und zum anderen vermutlich auch für die Anordnung des Aktinzytoskeletts verantwortlich ist. Bezüglich der Bindungsfähigkeit von Liganden scheint es sehr wahrscheinlich, dass FGFRa in der Lage ist FGFs zu binden (Sudhop, 2006).

Über FGFs bei *Hydra* ist noch weniger bekannt. Sudhop (2006) gelang es ein mögliches FGF, HvFGF1/2, aus *Hydra vulgaris* Zürich zu identifizieren. Es weist die für FGF typische *Core*-Region auf und besitzt Sequenzähnlichkeiten zu den FGFs der Unterfamilie 1/2. Ein funktioneller Beweis, dass FGFRa und HvFGF miteinander interagieren steht noch aus.

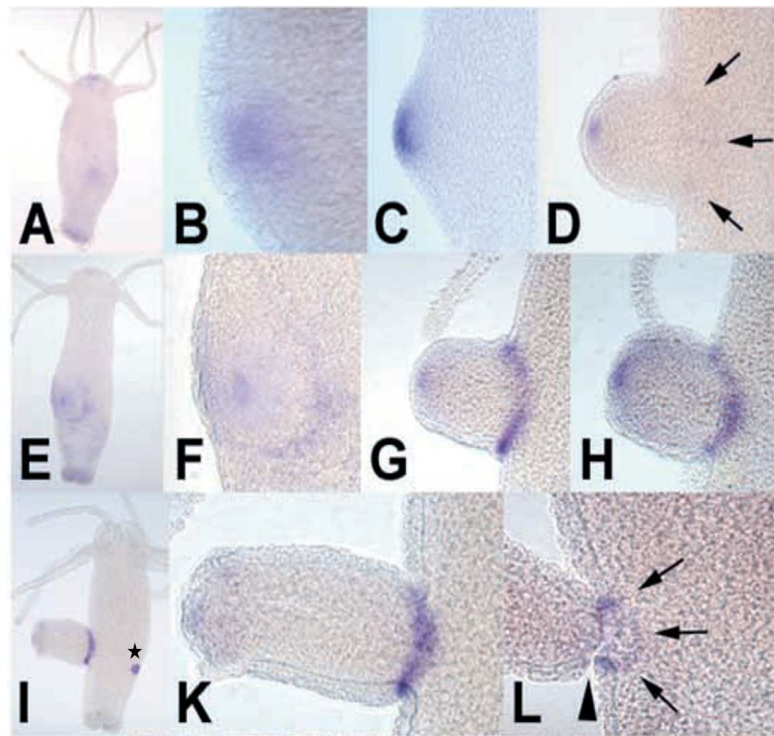


Abbildung 2.16:
Transkriptionsmuster von *fgfra* während der Knospung.

(A-B) *fgfra* Transkription in Knospenstadium 1. (C) *fgfra* Transkription in Knospenstadium 3. (D) *fgfra* Transkription in Knospenstadium 4, schwarze Pfeile: Transkription an der Knospenbasis, (E-H) *fgfra* Transkription in Knospenstadium 5. (I-K) *fgfra* Transkription in Knospenstadium 7, schwarzer Stern: Knospenablösestelle (L) *fgfra* Transkription in Knospenstadium 10, schwarzer Pfeilkopf: Ablösungszone.

[Einteilung der Knospenstadien nach Otto und Campbell (1967)]
[verändert nach: Sudhop et al., 2004]

2. 3 Ziel der Arbeit

Ziel meiner Arbeit ist es, durch die Identifizierung und Charakterisierung von FGFs und FGFRs bei *Hydra*, weitere Einblicke in die molekularen Prozesse der Morphogenese und der Achsenbildung zu erhalten. Zudem hoffe ich durch phylogenetische Untersuchungen einen Einblick in die Evolution des FGF/FGFR-Signalwegs zu erhalten bzw. herauszufinden inwieweit der FGF/FGFR-Signalweg und seine Funktionen evolutiv konserviert sind. Dabei sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Wie viele und welche FGFs bzw. FGF-Rezeptoren gibt es bei *Hydra*?
- Wo lassen sich diese phylogenetisch einordnen?
- Welche Eigenschaften besitzen FGFs bzw. FGF-Rezeptoren von *Hydra*?
- Wie sehen die Transkriptionsmuster und die Proteinverteilung aus?
- Welchen Funktionen könnten sie besitzen; sind sie an Prozessen wie der Zell- und Gewebewanderung und/oder Differenzierung und Morphogenese von *Hydra* beteiligt?

3 Material und Methoden

3. 1 Materialien

3. 1. 1 Tiermaterial

3. 1. 1. 1 Versuchstiere

Hydra vulgaris AEP

Hydra vulgaris Zürich

3. 1. 1. 2 Futtertiere

Artemia salina

3. 1. 2 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α

3. 1. 3 Zelllinien

JM109 (Promega)

3. 1. 4 Vektoren

pGEM®-T Easy (Promega)

3. 1. 5 Marker

RNA	RNA Ladder #SM1823	Thermo Scientific
DNA	O'GeneRuler DNA Ladder Mix #SM1173	ThermoFischer Scientific
Protein	PageRuler Prestained Protein Ladder #26616	Thermo Scientific

3. 1. 6 Lösungen

3. 1. 6. 1 Hydrahälterung

Hydramedium (HM)	KCl
pH-Wert 7,4	CaCl ₂
	K ₂ CO ₃
	NaHCO ₃
	MgSO ₄
	in MilliQ H ₂ O
Volvic-natürliches Mineralwasser	im Getränkehandel erhältlich
künstliches Meerwasser für <i>Artemia salina</i>	1 kg Meersalz 30 l VE-Wasser

3. 1. 6. 2 Klonierung

LB-Medium (1 l)	10 g Pepton 5 g Hefe 10 g NaCl 1 l MilliQ-H ₂ O
LB-Agar (1 l)	1 l LB-Medium 15 g Agar
SOB-Medium (1 l)	20 g Pepton 5 g Hefe 0,58 g NaCl 0,19 g KCl
SOC-Medium (10 ml)	10 ml SOB-Medium 100 µl MgCl ₂ [1 M] 100 µl MgSO ₄ [1 M] 100 µl Glucose [2 M]

IPTG	[200 mg/ml H ₂ O] steril
X-Gal	[100 mg/5 ml DMF] steril
Ampicillin	[50 mg/ ml H ₂ O]

3. 1. 6. 3 Pharmakologische Behandlungen

SU5402 Lösung	SU5402 [10 µM] DMSO [0,1 %] ATP [1 mM] in Volvic
Alsterpaullon	Alsterpaullon [5 µM] DMSO [0,025 %] in HM

3. 1. 6. 4 *Whole Mount In situ* Hybridisierung auf ganze Tiere

Urethan	[2%] in HM (steril filtrieren)
Paraformaldehyd	[4%] in 1x PBS
Methanol	[100 %]
Ethanol	[100 %]
DEPC-Wasser:	1 l MilliQ-H ₂ O 400 µl DECP ÜN stehen lassen anschließend autoklavieren
10x PBS:	NaCl [1,5 M] Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O [0,08 M]

	NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O [0,02 M] 400 µl DEPC [100 %] 1 l MilliQ-H ₂ O pH- Wert 7,4 einstellen ÜN stehen lassen anschließend autoklavieren
1x PBS:	100 ml 10x PBS 900 ml DECP-Wasser
1x PBT	50 ml 1x PBS 500 µl Tween 20 [10%]
Proteinase K	[10mg/ml DEPC-Wasser]
Glycerin	[40 mg/ml DEPC-Wasser]
Triethanolamin	[0,1 M] pH-Wert 7,8
Essigsäureanhydrid	[100 %]
Hybridisierungslösung	Formamid [50 %] SSC [5x] Torula RNA [200 µg/ml] Tween 20 [0,1 %] CHAPS [0,1 %] Denhardt's [1x] Heparin [10 mg/ml] in DEPC-H ₂ O
reduzierte Hybridisierungslösung	Hybridisierungslösung ohne torula RNA, Heparin und Denhardts
20x SSC	NaCl [3 M] NaCitrat [0,3 M] in DEPC-Wasser

EDTA	[0,5 M]	
MAB	Maleinsäure [100 mM] NaCl [150 mM] pH-Wert 7,5 einstellen	
MAB-B	MAB BSA [1 %]	
Blocklösung	MAB-B [80 %] Schafserum [20 %]	
Antikörper	anti-Dig-AP	präabsorbiert
NTMT	NaCl Tris-HCl pH-Wert 8 MgCl ₂ Tween 20 [10 %]	
NBT/BICP	gebrauchsfertige Lösung	
Tetramisol	[1M]	

3. 1. 6. 5 Western Blot

10x Laufpuffer	Tris [250 mM] Glycin [1,92 M] SDS [1 %] auf 1 l steriles Wasser pH-Wert 8,3-8,5 einstellen
1x Laufpuffer	100 ml 10x Laufpuffer 0,1 % SDS auf 1 l steriles Wasser

Trenngelpuffer	Tris-HCl [1 M] pH-Wert 8,8
Sammelgelpuffer	Tris-HCl [1 M] pH-Wert 6,8
Transferpuffer	1x Laufpuffer ohne SDS Methanol [20 %] frisch ansetzen
SDS	[10 %]
H ₂ O ₂	[30 %]
Acrylamid/ Bisacrylamid	[30 %/80 %]
APS	[10 %] in sterilem Wasser frisch ansetzen
TEMED	[100 %]
steriles Wasser	
10x Na-Phosphatpuffer [0,1 M], pH-Wert 7,4	Na ₂ HPO ₄ +2H ₂ O [0,1 M] NaH ₂ PO ₄ +H ₂ O [0,1 M] Titrierung der Lösungen auf pH-Wert 7,4
10x PBS	87,7 g NaCl 1 l 10x Na-Phosphatpuffer [0,1 M]
1x PBS	100 ml 10x PBS 900 ml steriles Wasser
PBT	1x PBS Triton X-100 [0,1 %]

2x Probenpuffer	SDS [2 %] Glycerin [20 %] Mercaptoethanol [2 %] Tris-HCl pH-Wert 6,8 [20 mM] Bromphenolblau [0,025 %]
Blocklösung	Casein [5 %] PBT
1. Antikörper	anti-FGF-f rb _{1/2} anti-HvFGFRL1 rb _{1/2} anti-FGFRa rb ₁ anti-Aktin jeweils in Blocklösung
2. Antikörper	Anti-rb Peroxidase gekoppelt in Blocklösung
Chemolumineszenz (ECL) -Lösung a	50 mg Luminol 200 ml Tris-HCl pH-Wert 8,6
ECL-Lösung b	11 mg para-Hydroxycoumarinsäure 10 ml DMSO
ECL-Arbeitslösung	1 ml ECL-Lösung a 100 µl ECL-Lösung b 0,3 µl H ₂ O ₂ [30 %]
3. 1. 6. 6 Immunhistochemie ganzer Tiere	
10x Na-Phosphatpuffer [0,1 M], pH-Wert 7,0	Na ₂ HPO ₄ +2H ₂ O [0,1 M] NaH ₂ PO ₄ +H ₂ O [0,1 M] Titrierung der Lösungen auf pH-Wert 7,0
1x PBS pH-Wert 7,0	Na- Phosphatpuffer [0,01 M] NaCl [0,15 M]

Urethan [2 %]
in HM (steril)

PFA [4 %]
in 1x PBS
pH-Wert 7,0

1x PBT 1x PBS
pH-Wert 7,0
Triton X-100 [0,25 %]

Blocklösung Ovalbumin [1 %]
BSA [1 %]
Na-Azid [0,1 %]
in 1x PBT

1. Antikörper anti-FGF-f rb₁

2. Antikörper anti-rb FITC gekoppelt

DAPI 1:10.000 in 1x PBT

Mowiol/Dabco

3. 1. 6. 7 Immunhistochemie Einzelzellpräparate

Mazerationslösung ein Teil Glycerin [100 %]
ein Teil Eisessig [100 %]
13 Teile Wasser [100 %]

Formaldehyd [37 %]

Blocklösung BSA [2 %]
EGTA [50 mM]
in 1x PBT

restliche Lösungen wie bei Immunhistochemie auf ganze Tiere

3. 2 Methoden

3. 2. 1 Die Hälterung von *Hydra*

Die Tiere wurden in 20x20 cm großen und durchsichtigen Plastikboxen in künstlich-angesetzten Hydramedium (HM), bei konstant 18 °C, gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus, gesteuert über eine Zeitschaltuhr, ist 16 h Tag und 8 h Nacht, so dass den Tieren vorgemacht wird, es sei Sommer. Gefüttert wurden die Tiere montags, mittwochs und freitags mit *Artemia salina*. 5 h nach der Fütterung wurden die Tiere ausgewaschen, und einmal die Woche umgesetzt. Für die Versuche wurden Tiere verwendet, die 24 h lang gehungert hatten.

3. 2. 2 Herstellung von Kopf- und Fuß-Regeneraten von *Hydra*

Zur Herstellung von Regeneraten wurden knospenlose Polypen mit einer Kanüle bei 50 % Körperlänge durchgeschnitten. Für die Regeneration wurden die Hälften auf 6-well Platten verteilt, jeweils 10 Hälften pro well, getrennt nach Kopf- bzw. Fußregeneraten. Nach einer, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 24, 30, 36 und 48 h Regenerationszeit wurden die Regenerate für *Whole Mount in situ* Hybridisierung (ISH) fixiert.

3. 2. 3 RNA-Isolation mit Tri-Reagenz

Für die Isolation der RNA wurden 100 mg Hydregewebe gesammelt. Hierzu wurden Tiere aller Stadien, die mind. 24 h gehungert hatten, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Nachdem das restliche HM entfernt war, wurde 1 ml Tri-Reagenz auf die Tiere gegeben. Durch anschließendes auf- und abpipettieren wurden die Tiere zerlegt, so dass die Tri-Reagenzlösung die RNA, DNA und Proteine herauslösen konnte. Danach wurde das Ganze für 5 min bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen und anschließend 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der klare, rosafarbene Überstand, mit der heraus gelösten RNA, DNA und den Proteinen, wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und der Rest verworfen. Zum Überstand wurden 200 µl Chloroform pipettiert, und alles 15 sec. gevortext. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Lösung bei 13.000 rpm 15 min zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren erhält man eine drei-gliedrige Phasentrennung. Die oberste Phase ist klar und enthält die RNA, die mittlere Phase ist leicht trüb und zähflüssig. Sie enthält Proteine und auch DNA-Fragmente. Die unterste Phase ist rosa und enthält DNA. Die obere, klare Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und der Rest verworfen. Zur Fällung der RNA wurden 500 µl -20 °C kaltes Isopropanol dazugegeben

und alles kurz gevortext und dann 5 min lang bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75 % Ethanol (in DEPC-Wasser) gewaschen, kurz gevortext und für 5 min erneut bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt und das Pellet für 10 min bei RT getrocknet. Nachdem kein Ethanol mehr zu riechen war, wurde das Pellet in 30 µl 60 °C warmen DEPC-H₂O gelöst. Für die Mengenbestimmung wurden ein 1 µl der isolierten RNA in 99 µl DEPC-H₂O verdünnt, und mittels Photometer gemessen. Als Null-Kontrolle dienten 100 µl DEPC-H₂O. Für kurzfristige Experimente wurde die RNA bei -20 °C und für einen längerfristigen Zeitraum bei -80 °C gelagert.

3. 2. 4 First strand cDNA Synthese mit Fermentas Kit: RevertAid Permium-First Starnd cDNA Synthesis Kit #K1651/2

Für die Synthese der cDNA wurden zunächst alle Kit-Komponenten für 30 min auf Eis aufgetaut und 5 sec. bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert und anschließend wieder auf Eis gelagert. Für die RT-PCR wurden 5 ng RNA, 1 µl Oligo (dT)₁₈ Primer, 1 dNTP Mix in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit nucleasefreiem Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Diese Mischung wurde kurz sanft gemischt und 5 sec. abzentrifugiert. Anschließend inkubierte alles 5 min bei 65 °C im Wasserbad, kurz auf Eis abgekühlt und erneut 5 sec. abzentrifugiert. Als nächstes wurden 4 µl 5x RT Puffer und 1 µl ReverAid™ Premium Enzyme Mix dazugegeben, alles sanft gemischt und 5 sec. abzentrifugiert. Die anschließende Inkubation erfolgte für 30 min bei 50 °C im Wasserbad. Zum Beenden der Reaktion wurde alles für 5 min bei 85 °C erhitzt. Die so erhaltene cDNA wurde für eine Woche bei -20 °C oder für längere Zeit bei -80 °C gelagert.

3. 2. 5 Primerdesign

Um geeignete Primer zu designen, wurde zum einem das *Primer designing tool* (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) von NCBI und zum anderen das Programm Oligo 500 genutzt. Beim Design wurde darauf geachtet, dass die Primer eine Mindestlänge von 20 Nukleotiden hatten. Des Weiteren wurde versucht, dass die Primer einen C/G-Gehalt zwischen 20 und 80 % aufwiesen. Die benötigte Annealingtemperatur sollte um 64 °C liegen und nicht mehr als 3 Nukleotide sollten an einem möglichen Rückfaltungsloop beteiligt sein. Für die FGFs und FGF-Rezeptoren wurden z.T. verschiedene *forward* und ein *reverse* Primer entworfen (Tab. 3.1). Alle Primer wurden im Zuge der Herstellung HPLC gereinigt.

Tabelle 3.1: selbst designte Primer zur Isolation der cDNA, die für die verschiedenen *Hydra* FGFS, FGFRb und HvFGFRL1 codiert

FGF/FGFR	<i>forward</i> Primer	<i>reverse</i> Primer
FGF-a	CACATACTGAACTTTTTAGTCCC	ATAAGCATCATCAAACAGTTCCC
FGF-b	CTATCGCAACCAGTACCAACC	AAATATAAAGCGGAGCGG
FGF-c	GCAAAAGGAATGGAGCGCAG	ACTCGAGTAACTACTGTCCTAG
FGF-d	TCCCCGATTGACCGAGGCTG	CATGCCGGCAATCCAAGTATAG
FGF-e	TATTACGGAGATTCACGATGTTG	TTGGAGCACTGGACGTGTTAG
FGF-f	CGCTTGCAAGCAACCGACTCATG	ACTCATCGTTGGAAGCCACATG
FGFRb_ex	GTCCCTGTGTAATAAGCAAAATG	TGAGGGTTAGGTAGAAATGCAG
FGFRb_in	CTCGAAGTGATATATGGTCATTTG	TTAAACAAATCTGTATTCAACATGC
FGFRb_Stop	GTGAGACTCGATGATGCTGG	GGATTTGTCATGCTGTAAACG
FGFRb_Mitte	CGTTTACAGCATGACAAATCC	CAAATGACCATATATCACTTCGAG

3. 2. 6 Amplifizierung bestimmter cDNA-Sequenzen

Für die Amplifizierung einer gewünschten cDNA-Sequenz mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden alle benötigten Komponenten (Tab. 3.2) auf Eis aufgetaut und in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß zusammen pipettiert. Abhängig von der zu amplifizierenden Größe des cDNA Stückes und der Beschaffenheit der designten Primer, wurde das Programm zur Amplifizierung entsprechend gewählt. Ein Programm sah wie folgt aus: 2 min 94 °C, 2 min 56-60 °C (abhängig von den verwendeten Primern), 2 min 72 °C, da nach folgten 30 Zyklen 1 min 94 °C, 1 min 56-60 °C (abhängig von den verwendeten Primern) und 1 min 72 °C. Zum Schluss 10 min 72 °C und anschließend, bis zur Weiterverarbeitung 4 °C. Das Cyclor-Programm dauerte etwa 3,5-4 h.

Zur Überprüfung, einer erfolgreichen Amplifizierung, wurden 5 µl PCR Produkt mit 1 µl 6x Orange DNA Loading Dye versehen und im Wasserbad für 2 min auf 68 °C erhitzt. Danach wurde alles mit 3 µl O'GeneRuler DNA Ladder Mix auf ein 1, 5 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 120 V für 45 min. Anschließend wurde das Gel mit 0,0001 % Ethidiumbromid 15 min gefärbt. Für die Bestimmung der Bandengröße wurde eine Eichkurve (Abschnitt 3. 2. 7) erstellt. Zur Lagerung wurde die amplifizierte cDNA bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 3.2: Komponenten für second strand cDNA

Lösung	Volumen pro Ansatz
Steriles Wasser	10,32 µl
First Strand cDNA	1,6 µl
10x PCR Puffer	2 µl
spezifischer forward Primer [10 pmol]	1 µl
spezifischer reverse Primer [10 pmol]	1 µl
dNTP Mix [2 mM]	2 µl
MgCl ₂ [25 mM]	2 µl
Taq Polymerase [5 U/µl]	0,08 µl

3. 2. 7 Erstellen einer Eichkurve zur Größenbestimmung von cDNA-Fragmenten, Sondengrößen und Proteinbanden

Für die Erstellung einer Eichkurve wurden die Laufstrecken der einzelnen Markerbanden vom Taschenboden aus bzw. beim Western Blot mit Beginn des Trenngels, gemessen. Die Laufstrecken der Markerbanden in cm wurden gegen die jeweiligen Markerbandengrößen (Basen, bp oder kDa) auf Millimeterpapier aufgetragen. Die einzelnen Punkte wurden dann miteinander verbunden. Anhand dieser Kurve konnten dann die Größen der cDNA-Fragmente, die Größen der Sonden und die Größe der Proteinbanden abgelesen werden. Dafür wurde ebenfalls die jeweilige Laufstrecke der Probenbande gemessen.

3. 2. 8 Klonierung von cDNA Fragmenten

3. 2. 8. 1 Ligation mit T4-DNA Ligase

Für die Ligation wurden die Komponenten auf Eis aufgetaut. Danach wurden die entsprechenden Mengen zusammen pipettiert und alles gut gemischt (Tab 3.3). Die Erfahrung hat gezeigt, dass die Ligation, wenn sie über Nacht (ÜN) ablaufen kann am besten funktioniert. Daher wurde die Ligation für 30 min bei RT gestartet und kam dann ÜN auf 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Reaktion durch Erhitzen, für 10 min bei 65 °C gestoppt. 5 µl der Ligation wurde für die Transformation genutzt und der Rest zum Lagern bei -20 °C weggefroren.

Tabelle 3.3: Komponenten für Ligation

Lösung	Volumen pro Ansatz
2x Rapid-Ligationspuffer	5 µl
pGMT-Esasy Vector	1 µl
gewünschte second Strand cDNA	2,5 µl
Steriles Wasser	0,5 µl
T4-DNA Ligase [3 U/ µl]	1 µl

3. 2. 8. 2 Herstellung chemokompetenter *Escherichia coli* mit CaCl₂

Als erstes wurden einige DH5α *E. coli* in 5 ml LB-Medium überführt und ÜN eine Kultur hochgezogen. Am nächsten Morgen wurden die 5 ml ÜN-Kultur auf zwei 100 ml Kolben verteilt und mit LB Medium auf jeweils 50 ml aufgefüllt. Mittels Photometer wurde die Optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Als Null-Kontrolle diente LB Medium. Um möglichst viele und „fitte“ Bakterien zu bekommen, sollte die OD zwischen 0,5 und 0,6 liegen. Bis diese erreicht war, kamen die Bakterien bei 37 °C und 250 rpm in den Inkubator. Damit die OD nicht überschritten wurde, wurde diese alle 30 min gemessen. Sobald die OD erreicht war, wurde die Bakteriensuspension in gekühlte 50 ml Flakons überführt und 5 min bei 4 °C und 4.000 rpm zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde dann in 20 ml eiskaltem CaCl₂ gelöst und inkubierte 30 min auf Eis. Danach wurde alles 5 min bei 4 °C und 4.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in 2 ml eiskaltem CaCl₂ [100 mM] gelöst. Nun wurden die Bakterien entweder für die Transformation genutzt oder 1:1 mit 30 % Glycerin (steril) versetzt, in flüssigem Stickstoff (N₂) schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3. 2. 8. 3 Transformation in DH5α *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurden 50 µl chemokompetente DH5α Zellen 5 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 µl der Ligation zugegeben. Alles inkubierte für 20 min auf Eis. Zum Aktivieren der „Heilungsfähigkeit“ der Bakterien kam die Bakterien-Plasmid-Mischung für 45 sec in ein 42 °C warmes Wasserbad und dann für 2 min auf Eis. Zum „Aufpäppeln“ der Bakterien wurden 950 µl SOC Medium zugegeben. Die Bakterien kamen dann für 1,5 h bei 37 °C und 150 rpm in den Inkubator. Danach wurden jeweils 300 µl der Bakteriensuspension auf ein LB-AMP Platte ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die einzelnen weißen Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher

gepickt und in 5 ml LB-Amp (Ampicillin) Medium gegeben. Diese kamen anschließend ÜN bei 37 °C und 250 rpm in den Inkubator.

3. 2. 8. 4 Plasmid-Minipräparation mit QIAprep Spin Miniprep Kit #27104 (Qiagen)

Für die Plasmidpräparation und die Überprüfung, ob die Ligation erfolgreich war, wurden nach und nach 4 ml der ÜN-Kultur (Abschnitt 3.2.8.3) in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Dann wurde das Pellet in 250 µl P1 Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl P2 Puffer wurde alles durch 6-mal invertieren vorsichtig gemischt. Als drittes wurden 350 µl N3 Puffer zugegeben und erneut durch 6-maliges invertieren gemischt. Anschließend wurde alles für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, welcher die herausgelösten Plasmide enthält, wurde in ein QIAprep Säulchen pipettiert und das Säulchen auf ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß gesteckt. Danach wurde erneut 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, wodurch die Plasmide auf der Membran des Säulchens gebunden wurden. Der Durchfluss wurde verworfen und auf das Säulchen wurden, zum Waschen, 750 µl PE Puffer gegeben und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und, um den gesamten PE Puffer wider zu entfernen, wurde erneut für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend kam das Säulchen auf ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß und es wurden 50 µl EB Puffer auf das Säulchen pipettiert. Um die Plasmide von der Säulchenmembran zu lösen, wurde alles 1 min stehen gelassen und zum Runterwaschen 1 min zentrifugiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein 1 µl Plasmid in 99 µl EB Puffer verdünnt und mittels Photometer gemessen. Als Null-Kontrolle dienten 100 µl EB Puffer. Für die Sequenzierung, wurden mindestens 700 ng Plasmid mit 10 pmol T7 oder SP6 Primer, an die Firma SeqLab geschickt. Das restliche Plasmid wurde bei -20 °C gelagert.

Die übrige ÜN-Kultur, sofern es sich bestätigte, dass das enthaltene Plasmid das gesuchte Insert trug, wurde in 100 µl 1:1 mit 30 % Glycerin (steril) versetzt aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3. 2. 9 Herstellung von mRNA-Sonden für die *Whole Mount In situ* Hybridisierung

Zur Sondenherstellung musste als erstes die gewünschte Sequenz mittels PCR (Insert PCR) amplifiziert werden. 1 µl der Plasmid-DNA Lösung (mindestens 300 ng/µl) wurde 1:100 verdünnt und, mit den für die PCR nötigen Lösungen (Tab. 3.4), vermischt. Das PCR Programm (Tab. 3.5) lief etwa 3,5 h.

Da RNAs sehr leicht von RNAsen abgebaut werden können, ist es wichtig RNase frei zu arbeiten und Handschuhe zu tragen.

Für die Sondensynthese wurden als erstes sämtliche Komponenten (Tab. 3.6) mit Ausnahme des 10x Transkriptionspuffer auf Eis aufgetaut. Damit sich die Bestandteile des Puffers lösen, wurde dieser im Wasserbad auf 37 °C erhitzt. Anschließend wurden die Lösungen in den jeweiligen Mengen (Tab. 3.6) in 0.5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis zusammen pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 37 °C im Cyclor. Zum Fällen der Sonde wurden 1,25 µl 4M LiCl und 38 µl 100 % Ethanol hinzu pipettiert, kurz zentrifugiert und anschließend für 30 min bei -80 °C inkubiert. Dann wurde alles 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 75 % Ethanol (in DECP-Wasser) gewaschen. Erneut wurde für 15 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet für 15 min an der Luft getrocknet, bis kein Ethanol mehr zu riechen war. Zum Schluss wurde das Pellet in 50 µl 55 °C warmen DEPC-Wasser gelöst und bis zur Nutzung in der ISH bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3.4: Komponenten für Insert PCR

Lösung	Volumen pro Ansatz
steriles Wasser	11,8 µl
10x PCR Puffer	2 µl
MgCl ₂ [25 mM]	2 µl
Forward Primer (T7) [10 pmol]	1 µl
Reverse Primer (SP6) [10 pmol]	1 µl
dNTPs [2 mM]	1 µl
Plasmid-DNA [3 ng/µl]	1 µl
Taq Polymerase [5 U/µl]	0,2 µl

Tabelle 3.5: Insert PCR-Programm

Schritt	Dauer	Temperatur
1	1 min	95 °C
2	30 sec	48 °C
3	3 min	72 °C
4	Goto Schritt 1, 30-mal	
5	10 min	72 °C
6	30 min	4 °C

Tabelle 3.6: Ansatz für die Sondensynthese

Lösung	Volumen pro Ansatz
DEPC-Wasser	6 µl
10x Transkriptionspuffer	1 µl
10x Dig. Labeling Mix	1 µl
Insert PCR-Produkt [0,015 ng/µl]	1 µl
RNA Polymerase (SP6 oder T7) [20 U/µl]	1 µl

3. 2. 10 Northern Blot

Zur Analyse der hergestellten mRNA-Sonden wurde ein Northern Blot durchgeführt. Auch hier wurde RNasefrei gearbeitet. Um die benötigte Gelkammer, den Kamm und den Gelschlitten RNase frei zubekommen, wurden diese für 30 min in 0,1 M NaOH gelegt und anschließend mit VE (voll-entsalzt)- und DEPC-Wasser gespült. Nach der Trocknung aller Geräte, wurde zunächst ein circa 2 cm dickes Gel gegossen und 30 min zum Aushärten stehen gelassen. Währenddessen wurden die Sonden und der Marker vorbereitet: 1 µl der hergestellten Sonden wurde 1:10 in DEPC-Wasser verdünnt. 1 µl verdünnte Sonde wurde dann mit 4,5 µl DEPC-Wasser, 1 µl 10x MOPS, 3,5 µl Formaldehyd, 10 µl Formamid versetzt. Beim Marker wurden 3 µl Marker und entsprechend weniger DEPC-Wasser verwendet. Die Ansätze mit Sonde und Marker wurden 15 min bei 55 °C erhitzt, anschließend auf Eis gestellt und mit 2 µl 10x RNA Load versehen. Nachdem das Gel beladen war, erfolgte die Auftrennung bei 40 mA und dauerte etwa 2,5 h. Während des Gellaufes wurden 6 Gel-große *Whatmanpaper*, eine Hybond-N Membran in Gelgröße und ein *Whatmanpaper*, das dreimal so breit war wie das Gel, zugeschnitten. Nachdem Gellauf wurde die Blot wie folgt aufgebaut: In eine Wanne mit 20x SSC (Transferpuffer) kam ein kleines Podest. Auf dieses wurde das mit 20x SSC getränkte große *Whatmanpaper* gelegt, so dass es links und rechts in 20x SSC lag. Auf dieses Papier kamen mittig die ersten drei gelgroßen, mit 20x SSC getränkten *Whatmanpaper*. Um Luftblasen zu entfernen, die den Transfersog stören würden, wurde einer Glaspipette über die *Whatmanpaper* gerollt. Dann folgte bündig das Gel. Zu beachten ist, dass das Gel mit der Rückseite nach oben liegt, da der Transfersog nach oben stattfindet. Damit der Sog durch das Gel ging, wurde das Gel an allen Seiten mit Frischhaltefolie abgedeckt. Als nächstes wurde die Membran bündig auf das Gel gelegt. Darauf wurden dann die zweiten drei gelgroßen, mit 20x SSC getränkten *Whatmanpaper* gelegt. Auch an dieser Stelle wurde nochmal mit einer Glaspipette über die *Whatmanpaper* gerollt. Letztendlich kam ein circa 5 cm dicker Stapel Saugpapier und darüber eine Plastikplatte oben drauf. Damit alles zusammenhielt und es einen gleichmäßigen Sog nach oben gab, wurde ein gleichmäßiges Gewicht, z.B. das Buch

Kükenthal Zoologisches Praktikum, darauf gelegt. Nach dem Transfer ÜN wurde der Stapel vorsichtig abgebaut und auf der Membran wurden mit Bleistift die Geldtaschen und die Stelle des Markers markiert. Danach wurde die Membran für 2 min mit 3x SSC gewaschen, zwischen zwei *Whatmanpaper* gelegt und für 1 h bei 80 °C getrocknet. Anschließend wurde die Markerspür abgeschnitten und 10 min in 0,02 % Methylenblau mit 0,3 M Na-Acetat pH-Wert 5,5 gefärbt. Zum Entfärben und besseren Hervorheben der Markerbanden, wurde zum Schluss noch mit VE-Wasser gewaschen. Der Teil der Membran mit den Sonden wurde zunächst kurz in Waschpuffer gewaschen und dann in ein Plastiktütchen mit Blocklösung eingeschweißt. Nach einer Stunde blocken bei RT wurde die Membran erneut kurz in Waschpuffer gewaschen und in ein Plastiktütchen mit präabsorbierten Antikörper eingeschweißt. Nach 30 min bei RT wurde die Membran für 30 min zum dritten Mal in Waschpuffer und 2 min in Färbepuffer gewaschen. Zum Färben wurde die Membran mit Färbelösung, wieder eingeschweißt und dunkel gehalten. Die Kontrolle der Färbung wurde im Turnus von 3-mal 5 min und dann alle 15 min kontrolliert. Sobald die Färbung stark genug war, wurde die Membran kurz in Färbepuffer gewaschen und anschließend mit VE-Wasser gespült und getrocknet. Die Bestimmung der Sondengrößen erfolgte mittels einer Eichkurve (Abschnitt 3. 2. 7).

3. 2. 11 Dot Blot

Zur Bestimmung, welche Sondenkonzentration geeignet ist, wurde ein Dot Plot durchgeführt. Dazu wurde 1 µl der Sonden jeweils, pur, 1:10, 1:50, 1:100 und 1:500 verdünnt, auf einen Streifen der Hybond-N Membran aufgetragen und für 1 h bei 80 °C gebacken. Die weiteren Schritte und Lösungen sind identisch mit denen des Northern Blots.

3. 2. 12 *Whole Mount In situ* Hybridisierung (ISH)

Bei der ISH handelt es sich um eine molekularbiologische Methode zur Sichtbarmachung von räumlicher und zeitlicher Gentranskription, durch den Nachweis von mRNA mittels einer antisense mRNA-Sonde. Als Negativkontrolle und zur Spezifizierung des Ergebnisses der antisense mRNA-Sonde wurde die jeweilige sense mRNA-Sonde verwendet. Auch hier ist es wichtig RNase frei zu arbeiten und Handschuhe zu tragen.

3. 2. 12. 1 Fixierung der Tiere für ISH

Für ISH wurden Tiere im entsprechenden Stadium, die mind. 24 h gehungert hatten, in einem 2 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Das HM wurde durch 2 % Urethan in HM ersetzt.

Nachdem die Tiere 1 min unter Licht relaxiert wurden, kamen sie zum Fixieren in 4 °C kühles 4 %iges PFA in PBS (pH-Wert 7,4) und ÜN bei 4 °C auf den Schüttler (70 rpm). Am nächsten Tag wurden die Tiere mittels aufsteigender Methanolreihe in 100 % Methanol überführt. Um eine spätere Hintergrundfärbung zu minimieren, wurden die Tiere mindestens 3 d in 100 % Methanol bei -20 °C gelagert, bevor sie für die ISH herangezogen wurden.

3. 2. 12. 2 Durchführung ISH

Die im Folgenden beschriebenen Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben, 5 min bei Raumtemperatur (RT) und auf dem Schüttler bei 50 rpm durchgeführt.

Nachdem die Tiere mind. 3 d in 100 % Methanol gelagert waren, wurden sie zum Entfetten, in 100 % Ethanol überführt. Nach 30 min wurden sie über eine absteigende Ethanolreihe in 1xPBT überführt und 3-mal mit PBT gewaschen. Damit die Sonde später optimal in das Gewebe eindringen kann, muss das Gewebe angedaut werden. Dafür inkubierten die Tiere in einer Lösung aus 10 µg Proteinase K pro ml PBT. Hierbei ist Zeiteinhaltung wichtig, um eine komplette Gewebeerstörung zu verhindern. Die Dauer der Inkubation ist dabei artabhängig. Bei *Hydra vulgaris* AEP wurden 15 min und bei *Hydra vulgaris* Zürich wurden 10 min inkubiert. Die Aktivität der Proteinase K wurde durch die Zugabe von 100 µl Glycin [40 mg/ml] gestoppt. Nach 10 min in dieser Lösung wurde 2-mal mit PBT gewaschen. Um freie geladene Ionen weg zu fangen, die die Hybridisierung mit der Sonde später stören könnten, wurden die Tiere einmal mit 0,1 M Triethanolamin (pH-Wert 7,8) und 2-mal mit einer Lösung aus Triethanolamin und 2,5 µl Essigsäureanhydrid [100 %] gewaschen. Hierbei ist zu beachten die Lösung aus Triethanolamin und Essigsäureanhydrid direkt vor Gebrauch anzusetzen und gut zu vortexen ist. Zum Nachfixieren der Tiere, wurden diese zunächst 2-mal in PBT gewaschen. Für das Nachfixieren wurde, wie schon zum Fixieren, 4 % PFA in PBS verwendet. Nach 20 min Nachfixierung wurden die Tiere 5-mal mit PBT gewaschen. Um störende endogene alkalische Phosphatasen zu inhibieren, da der AK für den späteren Sondernachweis eine alkalische Phosphatase trägt, wurde eine Lösung aus PBT und EDTA [0,5 M] auf die Tiere gegeben. Die Tiere inkubierten 10 min bei 85 °C im Wasserbad. Anschließend konnten die Proben auf RT abkühlen. Zur Vorbereitung der Tiere auf die Hybridisierung mit der Sonde, inkubierten die Tiere ÜN bei 55 °C im Wasserbad in der Prähybridisierungslösung. Am nächsten Tag wurde die pure Sonde für 1 min aufgekocht, kurz auf Eis gestellt und dann, abhängig von der Sonde in Prähybridisierungslösung verdünnt (Tab. 3.7) und auf die Tiere gegeben. Die so entstandene Hybridisierungslösung blieb für 3 d auf den Tieren, damit sie Sonde genug Zeit hatte zu binden. Am dritten Tag wurde die Sonde angenommen (bis zu 6-mal wiederverwendbar). Um die restliche Sonde zu entfernen wurde 15 min mit reduzierter Hybridisierungslösung und 2-mal mit 2x SSC und 0,1

% CHAPS gewaschen. Alle drei Waschschr tte erfolgten bei 55 °C im Wasserbad. Nach dem Entfernen der Sonde, wurde das Gewebe für den Antikörper vorbereitet. Dazu wurden die Tiere 2-mal 10 min in MAB und für 1 h in MAB-B gewaschen. Danach kamen die Tiere für mind. 2 h, bei 4 °C in Blocklösung, um unspezifische Bindestellen für den Antikörper zu blockieren. Nach dem Blocken wurde der pr absorbierte Antikörper auf die Tiere gegeben. Die Tiere inkubierten bei 4 °C und 70 rpm  N. Am nächsten Tag wurde der Antikörper (ebenfalls wiederverwendbar) abgenommen und durch MAB ersetzt. Um den überschüssigen, nicht gebundenen AK aus dem Gewebe zu entfernen und somit die Hintergrundfärbung zu minimieren, wurden die Tiere zunächst 5, 10 und 30 min mit MAB gewaschen. Anschließend folgten nochmals 5 einst ndige Waschschr tte mit MAB und ein letzter bei 4 °C und 70 rpm  N. Zur Vorbereitung auf die Färbung, wurden die Tiere am folgenden Tag 2-mal mit NTMT gewaschen und in eine 24-well Platte überführt. Als nächstes wurden die Tiere 2-mal in NTMT/Tetramisol, gewaschen und anschließend mit frisch angesetzter NBT/BCIP-Färbelösung versehen. Da die Färbelösung lichtempfindlich ist, wurde die 24-well Platte mit Alufolie umwickelt. Die Färbung wurde 3-mal nach 5 min und anschließend alle 15 min kontrolliert. Hatte sich während dieser Zeit die Färbelösung von gelb nach rosa umgefärbt, wurde sie durch neue, frisch angesetzte Färbelösung ersetzt. Sobald die Färbung stark genug war, wurde die Reaktion gestoppt. Dazu wurden die Tiere 2-mal mit NTMT/Tetramisol und mit 70 % und 100 % Ethanol gewaschen. Um eine aufgetretene Hintergrundfärbung zu entfernen, wurden, je nach Stärke der Hintergrundfärbung, die Tiere bis zu 30 min in 100 % Methanol gewaschen. Zum Einbetten in wurden die Tiere über eine absteigende Ethanolreihe in PBS und dann in 80 % Glycerin/PBS überführt und  N bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Tiere eingebettet. Um die Tiere nicht zu beschädigen, wurden zwei Lagen Klebestreifen, als Abstandhalter, auf die Objektträger aufgebracht. Zur optischen Analyse, sowie zur Aufnahme der Bilder wurden ein Binokular und ein Mikroskop von Nikon verwendet.

Tabelle 3.7: Sondenverd nnungen

mRNA-Sonde	Verdünnung
FGF-a	1:100, 1:500
FGF-c	1:100, 1:500
FGF-e	1:100, 1:500
FGF-f	1:250
FGFRb_ex	1:500
FGFRb_in	1:500
HVFGFRL1	1:500

3. 2. 13 Epitopermittlung und Antikörperherstellung

Zur Herstellung von spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen FGFRa, FGF-f_HAEP (FGF-F) und FGFRLike1 (HvFGFRL1) aus *Hydra vulgaris* AEP wurden bei der Firma Davids Biotechnologie GmbH Peptidsynthesen, Antikörperherstellung und Aufreinigung durchgeführt. Bei der Suche nach einem geeigneten Epitop wurde zum einen darauf geachtet, dass eine hohe Antigenizität vorliegt. Zum anderen war es wichtig, dass das Epitop für einen möglichen AK gut zugänglich ist, also möglichst an der Oberfläche des Peptids lag. Als dritter Parameter wurde ein Algorithmus benutzt, welcher ermittelt, ob das Epitop sich eignet B-Zellen zur Produktion von spezifischen Antikörpern zu stimulieren. Anhand dieser Parameter wurde für FGFRa ein Epitop innerhalb der dritten Ig-ähnlichen Schleife ausgewählt. Für FGF-f wurde als Epitop der C-Terminus genutzt und das Epitop von HvFGFRL1 sitzt unmittelbar hinter dem Signalpeptid (Tab. 3.8). Um auszuschließen, dass die in Frage kommenden Epitope in anderen Proteinen vorhanden sind, wurden die Epitope in die Datenbank NCBI, Compagen und EMBL geschickt. Bei allen drei Datenbanken zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. In den Datenbanken von NCBI und EMBL wurde das Epitop für FGFRa mit 100 % der Proteinsequenz von FGFRa (Sudhop et al., 2004) zugeordnet. Alle anderen Treffer waren Übereinstimmungen mit unbekannten Proteinen in anderen Organismen und wiesen nur eine Identität von 66,6 % auf. Zudem fehlten Aminosäuren (AS) in den Übereinstimmungen bzw. wurden nicht berücksichtigt. In der Compagen Datenbank war ein Vergleich nur mit *Hydra magnipapillata* möglich, aber auch hier wurde das Epitop von FGFRa *Hydra magnipapillata* zu geordnet. Für das Epitop von FGF-f gab es keinen Treffer in der EMBL Datenbank. In der NCBI Datenbank gab es eine 100 %ige Übereinstimmung mit einem unbekannten Protein aus *Hydra vulgaris*, wobei ein Vergleich der Sequenzen zeigt, dass es sich um FGF-f handelt. Bei Compagen gab es ebenfalls einen Treffer. Auch hier handelt es sich um FGF-f, allerdings aus *Hydra magnipapillata*. Für das Epitop von HvFGFRL1 gab es in Compagen und EMBL keinen Treffer und in der NCBI Datenbank fanden sich zwei Übereinstimmungen mit als FGFR Isoform X1 und X2 von *Hydra vulgaris* annotierten Proteinen. Alle anderen Übereinstimmungen lagen bei 60 % und auch hier wurden AS nicht berücksichtigt. Bezüglich der Spezifität der Epitop kann also davon ausgegangen werden, dass ein Antikörper nur diese erkennt.

Für die Immunisierung wurden jeweils 2 Kaninchen verwendet. Den Tieren wurde das Antigen, welches N-terminal an das *Keyhole limpet hemocyanin carrier protein* (KLH) gekoppelt wurde, über mehrere Wochen, immer wieder injiziert. Nach ausreichend hohem ELISA Titer (Tab. 3.9) wurde das Serum gewonnen und über eine Affinitätsmatrix gereinigt. Die Endkonzentrationen der Antikörper lagen zwischen 0,887 mg/ml und 2,07 mg/ml (Tab.3.9). Zudem wurde das Antigen HPLC gereinigt.

Tabelle 3.8: Antikörper-Epitope und vorhergesagte Eigenschaften

Antikörper	Epitop	Antigenizität	Zugänglichkeit	B-Zell-Stimulation
anti-FGFRa	LEKGQRRGNSISHIKLDY	mittel	gut-mittel	gut
anti-FGF-f	EVNKLNDEIEKMKLENLKKN	gut	gut	gut
anti-HvFGFRL1	DNTLPKKKQFYGKHENGASEM	gut	gut	gut

Tabelle 3.9: Daten zur Erzeugung der Antikörper

Antikörper	Kopplung	Reinigung	ELISA Titer	Konzentration [mg/ml]
anti-FGFRa rb ₁	KLH N-terminal	Affinitätsmatrix	1:080.000	1,200
anti-FGFRa rb ₂	KLH N-terminal	Affinitätsmatrix	1:300.000	0,500
anti-FGF-f rb ₁	KLH N-terminal	Affinitätsmatrix	1:300.000	0,887
anti-FGF-f rb ₂	KLH N-terminal	Affinitätsmatrix	1:300.000	1,210
anti-HvFGFRL1 rb ₁	KLH N-terminal	Affinitätsmatrix	1:300.000	2,070
anti-HvFGFRL1 rb ₂	KLH N-terminal	Affinitätsmatrix	1:300.000	1,880

3. 2. 14 Western Blot

Für den Funktionstest der AK anti-FGF-f und anti-HvFGFRL1 wurde ein etwa 8 cm hohes 15 %iges und für anti-FGFRa ein 12,5 %iges Acrylamid-Trenngel (Tab. 3.10) und ein 3 %iges Acrylamid-Sammelgel (Tab. 3.11) gegossen und ÜN bei 4 °C gelagert. Um zu ermitteln, wie viel prozentig das Gel sein muss, wurde mittels Protein-Molecular-Weight-Calculator Tool von science gateway die Proteingröße bestimmt (Tab. 3.12).

Tabelle 3.10: Komponenten für ein 12,5 %iges und ein 15 %iges Trenngel

Lösung	Konzentration	Volumen [ml]	
	Stammlösung	bei 12,5 %igem Trenngel	bei 15 %igem Trenngel
Steriles Wasser	---	5,7	3,15
Acrylamid/Bisacrylamid	30 %/80 %	12,54	15,00
Tris-HCl pH-Wert 8,8	1 M	11,25	11,25
SDS	10 %	0,3	0,3
APS	10 %	0,3	0,3
TEMED	100 %	0,03	0,03

Tabelle 3.11: Komponenten für ein 3 %iges Sammelgel

Lösung	Konzentration Stammlösung	Volumen [ml]
Steriles Wasser	---	11,25
Acrylamid/Bisacrylamid	30 %/80 %	1,5
Tris-HCl pH-Wert 6,8	1 M	1,875
SDS	10 %	0,15
APS	10 %	0,15
TEMED	100 %	0,015

Tabelle 3.12: Molekular Gewicht der Proteine

Protein	Molekular Gewicht [kDa]
FGFRa	93,4
FGF-F	31,5
HvFGFRL1	46,6

Die im Western Blot verwendeten AK-Verdünnungen wurden immer frisch angesetzt. Außer den Lösungen für den Western mit zuvor geblockten AK. Diese AK-Lösungen wurden am Tag zuvor angesetzt. Zum Blocken des Erst-AK wurde 1 µl Erst-AK [0,887-2,07 mg/ml] gegen 10 µl Peptid in 489 µl Blocklösung ÜN präabsorbiert.

Zur Präparation der Proben, für den Gellauf, wurde der 2x Probenpuffer auf 95 °C erhitzt. Währenddessen wurden 3 Hydren in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Das HM wurde durch 25 µl 95 °C warmen 2x Probenpuffer ersetzt. Die Proben kamen nochmal für 10 min auf 95 °C. Nach den ersten 5 min wurden die Tiere durch auf- und abpipettieren zerschert. Bis zum Auftragen auf das Gel kamen die Proben auf Eis. Nach dem Einspannen des Gels in die Laufkammer, wurden die Kammern mit 1x Laufpuffer gefüllt und die Taschen mit einer Kanüle in Form gebracht. Die Geltaschen wurden mit je 10 µl der Proben und eine mit 5 µl Marker beladen. Das Gel lief bis die Proben aus den Taschen gelaufen waren bei 80 V, dann bis die Proben das Trenngel erreicht hatten bei 120 V und anschließend, bis zum Schluss, bei 200 V. Nach dem Lauf wurde das Gel aus der Gelkammer genommen und das Sammelgel abgeschnitten. Das Trenngel wurde vermessen und anschließend 10 min in Transferpuffer gelagert. Entsprechend der Gelgröße wurden 12 Whatmann paper und die PVDF-Membran zugeschnitten. Die Membran wurde 10 min in Methanol und anschließend 10 min in Transferpuffer aktiviert. Für den Aufbau des Blots wurde in die Mitte der unteren Hälfte der Blotkammer etwas Transferpuffer gegeben. In den Transferpuffer wurden die ersten 6 mit Transferpuffer getränkten *Whatmannpaper* gelegt und mit Transferpuffer begossen. Anschließend wurde mit einer Glaspipette, um alle Blasen zu entfernen, über den Stapel, gerollt. Bündig darauf wurde die PVDF-Membran und darauf das Gel gelegt. Zum

Schluss wurden die zweiten 6 *Whatmannpaper*, ebenfalls bündig, auf das Gel gelegt und mit Transferpuffer übergossen. Erneut wurde mit einer Glaspipette über den Stapel gerollt. Bevor der Deckel der Blotkammer aufgelegt wurde, wurde der überschüssige Transferpuffer mit Saugpapier abgenommen. Damit alles gut zusammen hielt und gut geblottet wurde, wurde auf den Deckel noch eine 1/5 volle 500 ml Flasche gestellt. Geblottet wurde für 1 h 15 min bei 1,5 mA pro cm² Gel. Danach wurden auf der Membran die Spuren mit Bleistift markiert und nummeriert. Der Marker wurde abgeschnitten und getrocknet. Die restliche Membran wurde 5 min mit PBT gewaschen. Als nächstes wurde die Membran in die einzelnen Spuren zerschnitten und jede Spur in ein separates Gefäß gelegt und nochmal 5 min mit PBT gewaschen. Danach wurde die Blocklösung auf die Spuren gegeben und 2 h bei RT geblockt. Anschließend wurden die einzelnen Spuren in Plastiktütchen, die mit dem jeweiligen Erst-AK bzw. unterschiedlichen Konzentrationen des Erst-AK gefüllt waren, eingeschweißt. Diese Tütchen kamen ÜN bei 4 °C auf den Schüttler (70 rpm). Am nächsten Tag wurden die Spuren aus ihren Tütchen genommen und wieder in einzelne Gefäße zum Waschen gelegt. Gewaschen wurde 6-mal 10 min mit PBT. Dann wurde für 2 h, bei RT der 2. AK auf die Spuren gegeben. Anschließend wurde erneut 6-mal 10 min mit PBT gewaschen. Als nächstes wurde 2-mal 5 min mit VE-Wasser gewaschen. Für die Detektion mit ECL lagen die Streifen für 1 min in der ECL-Lösung. Danach wurden die Streifen, in der ursprünglichen Reihenfolge, nebeneinander auf Frischhaltefolie in eine Entwicklerkammer gelegt und dunkel gehalten. Die darauf folgende Belichtung von 30 Sekunden und bis zu 5 min und die Entwicklung der Filme wurde in einer Dunkelkammer vorgenommen. Auf die wieder zusammengesetzten Streifen wurde dann ein Film zur Exposition gelegt. Die Größen der detektierten Proteinbanden wurden mittels Eichkurve (Abschnitt 3. 2. 7) bestimmt. Bei sehr dicken oder schräg gelaufenen Banden wurde für die Ermittlung der Laufstrecke der Mittelpunkt der Bande genommen.

3. 2. 15 Immunhistochemie (IHC) auf ganze Tiere

5 Tiere wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß gesammelt und anschließend für 1 min in 2 % Urethan unter Licht relaxiert. Danach wurden die Tiere ÜN in 4 % PFA ins PBS, pH-Wert 7,0, fixiert. Am nächsten Tag wurden die Tiere 3-mal 15 min in PBT gewaschen. Als nächstes kamen die Tiere für 2 h bei RT in Blocklösung. Nachdem die Blocklösung durch die Erst-Antikörperlösung ersetzt wurde, inkubierten die Tiere ÜN bei 4 °C. Anschließend wurden die Tiere 3-mal 15 min in PBT gewaschen. Dann folgte die Inkubation mit dem 2. AK. Da dieser FITC gekoppelt ist, wurden ab jetzt die Proben dunkel gehalten. Der 2. AK kam für eine Stunde bei RT auf die Tiere. Danach wurde 6-mal mit PBT gewaschen, wobei im 4. Waschschrift noch DAPI zur Kernfärbung hinzugefügt wurde. Zum Schluss wurden die Tiere

in Mowiol/Dabco eingebettet und dunkel, bei 4 °C gelagert. Zur optischen Analyse, sowie zur Aufnahme der Bilder wurden ein Mikroskop von Nikon und das Konfokale Laserscan Mikroskop SP5 von Zeiss verwendet.

3. 2. 16 Immunhistochemie auf Mazerate

Für die Mazerat-Immunhistochemie, wurden 5 Tiere in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt und das Medium wurde vollständig abgenommen. Dann wurden 100 µl Mazerationslösung auf die Tiere gegeben und 20 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurden die Tiere durch sanftes auf- und abpipettieren zerlegt. Um die Zellen zu fixieren, wurden 10 µl 37 %iges Formaldehyd dazu gegeben und für 10 min bei RT stehen gelassen. Als nächstes wurden 50 µl der Zellsuspension auf einen Denhardts beschichteten Objektträger aufgetragen und quadratisch ausgestrichen. Nachdem die Zellen angetrocknet waren (nach etwas 1,5 h), wurden die Objektträger 3-mal 15 min mit PBT gewaschen. Dann inkubierten sie 2 h in Blocklösung bei RT. ÜN wurde der erst AK auf die Zellen gegeben. Am nächsten Morgen wurde 6-mal 20 min mit PBT gewaschen. Anschließend wurde für 2 h bei RT der 2. AK auf die Zellen gegeben. Da dieser FITC gekoppelt ist, wurden ab jetzt die Proben dunkel gehalten. Der 2. AK kam für eine Stunde bei RT auf die Tiere. Danach wurde 6-mal mit PBT gewaschen, wobei im 4. Waschschrift noch DAPI zur Kernfärbung hinzugefügt wurde. Zum Schluss wurden die Tiere in Mowiol/Dabco eingebettet und dunkel bei 4 °C gelagert. Zur optischen Analyse, sowie zur Aufnahme der Bilder wurden ein Mikroskop von Nikon und das Konfokale Laserscan Mikroskop SP5 von Zeiss verwendet.

3. 2. 17 Pharmakologische Behandlungen

3. 2. 17. 1 Die Behandlung mit dem FGFR Inhibitor SU5402

Zur Behandlung mit SU5402 wurden jeweils 10 Tiere mit einer Knospe im 3. Stadium in eine kleine Petrischale (Durchmesser 6 cm) für 24 h in einer Lösung aus SU5402/DMSO/ATP in Volvic inkubiert. Die Kontrollen bestanden a) aus DMSO/ATP in Volvic und b) aus purem Volvic. Sämtliche Inkubationen fanden im Dunkeln und bei 18 °C statt.

3. 2. 17. 2 Die Behandlung mit den WNT-Signalweg-Aktivator Alsterpaullon

Zur Überaktivierung der WNT-Signalweges und der Erzeugung ektopischer Tentakel wurden ungefütterte und knospenlose Tier für 2 d im Dunkeln und bei 18 °C in einer Lösung aus Alsterpaullon/DMSO in HM inkubiert. Danach wurden die Tiere 5-mal mit HM gewaschen.

Anschließend wurden die Tiere für 5 d in HM, bei normalem 16 h Tag- 8 h Nacht-Rhythmus und Fütterung alle 2 d stehen gelassen. Am fünften Tag wurden sie für die *In situ* Hybridisierung fixiert und bei -20 °C in Methanol [100 %] gelagert.

3. 2. 18 Datenbankrecherche

Um mögliche FGFs in *Hydra* zu finden, wurden die verschiedenen Datenbanken (Tab. 4.1) zum einen mittels Suchbegriffen, wie „FGF“ oder „*fibroblast growth factor*“, durchsucht. Zum anderen wurden auch die, bei allen FGFs vorhandene, Core-Region von FGF1 und 2 für die Suche genutzt.

3. 2. 19 Phylogenetische Analyse

Um mögliche Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den, für *Hydra* gefundenen FGFs und den schon bekannten FGFs zu ermitteln, wurden verschiedene bioinformatische Programme genutzt. Als erstes wurden die Sequenzen mittels ClustalX2 abgeglichen. Über das Programm GeneDoc wurde der von ClustalX2 erstellte Abgleich von Hand weiter bearbeitet und verfeinert. Dabei wurde geschaut, welche AS noch angeglichen werden konnten. Und auch welche Eigenschaften die AS haben, wurde für das Angleichen mit herangezogen. Danach wurde die GeneDoc-Datei mit MEGA 6 in eine NEXUS-Datei formatiert. Mit dieser Datei wurde anschließend durch das Programm MR Bayes ein Stammbaum errechnet. Um den ermittelten Baum zu verifizieren, wurde eine Zusammenarbeit mit Stefanie Bertrand, Frankreich aufgenommen. Unter Verwendung von Programmen, wie SeaView, ProtTest 3, Akaike information criterion (WAG+ Γ) und RAxML Version 8.0.9, wurde dann ein entgeltlicher phylogenetischer Baum (Ergebnis-Abb. 4.1) ermittelt. Die Gruppe der endokrinen FGFs wurde dabei aufgrund der Unvollständigkeit der Sequenzen außen vor gelassen.

3. 2. 20 Sequenzanalyse

Zur Untersuchung, ob die FGFs und FGFRs ein Signalpeptid besitzen, wurden die drei Programme SignalP 4.1, Predisi und Phobius verwendet. Zur Übersetzung der Nukleotidsequenz in die Aminosäuresequenz und um herauszufinden, welches der richtige Leserahmen ist, wurde das *Translate tool* von Expasy verwendet. Zur Struktur- und Domänenanalyse wurden die Programme Prosite und Pfam genutzt. Für die Vergleiche von FGFRa und FGFRb wurde für FGFRa die Protein- bzw. Nukleotidsequenz aus der NCBI Datenbank verwendet. Die Accession-Nummer der Proteinsequenz lautet AAO39416 und für die Nukleotidsequenz ist es AY193769.

4 Ergebnisse

Hydra besitzt einen einfachen Körperbau und dennoch laufen zum Beispiel während der Knospung sehr komplexe Musterbildungs- und morphogenetische Prozesse ab. Gesteuert werden diese unter anderem durch den evolutiv konservierten FGF/FGFR-Signalweg (Bertrand et al., 2013). Für *Hydra* war 2011 lediglich FGFRa (Kringelchen) bekannt, der die Knospenablösung kontrolliert (Sudhop et al., 2004), und ein FGF (HvFGF1/2) mit unbekannter Funktion (Sudhop, 2006).

4. 1 FGFs bei *Hydra*

Die nachgewiesene wichtige Funktion des FGFRa (Kringelchen) für die Knospenablösung bei *Hydra* (Sudhop et al., 2004; Hasse et al., 2014) sowie das Vorhandensein multipler FGFs und zweier FGFR bei der Anthozoe *Nematostella vectensis* (Matus et al., 2007) warf die Frage auf, ob auch bei *Hydra* weitere FGFs und FGF-Rezeptoren existieren. Um diese zu identifizieren, stehen mittlerweile Datenbanken vom *Hydra* Genom- und EST Projekte zur Verfügung (Chapman et al., 2010; Hemmrich und Bosch, 2008; Wenger und Galliot, 2013). Mögliche FGF Liganden für FGFRa, wurden daher mittels einer Datenbanksuche unter Verwendung der für FGF typischen Core-Region durchgeführt (Beenken und Mohammadi, 2009; Zhu et al., 1991).

4. 1. 1 Datenbankrecherche zum Auffinden von *Hydra* FGFs

4. 1. 1. 1 Für die Gattung *Hydra* werden in den verschiedenen Datenbanken bis zu 11 FGFs vorhergesagt

Insgesamt wurden 11 FGF-codierende Gene für die Gattung *Hydra* identifiziert (Tab. 4.1). Für die Art *Hydra vulgaris*, ohne genauere Spezifizierung, konnten vier FGFs (Wenger_sFGF8, FGFA_HYDVU, FGFB_HYDVU und FGFC_HYDVU) ermittelt werden. Für *Hydra vulgaris* AEP werden 5 FGF (FGFa_HAEP, FGFB_HAEP, FGFC_HAEP, FGFE_HAEP und FGFF_HAEP) vorhergesagt. Ein zunächst vermeintliches FGF-d erwies sich bei genauerer Untersuchung nicht als FGF. Es handelte sich lediglich um eine Cystein-reiche Sequenz, die daher nicht weiter untersucht wurde. Für die Arten *Hydra vulgaris* Zürich und *Hydra magnipapillata* wurde jeweils ein FGF, HvFGF1/2 (Sudhop, 2006) und FGFA_HYDMA identifiziert (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: Liste möglicher FGFs in *Hydra*

Spezies	Name des FGF	Accession-Nummer	Datenbank
<i>Hydra vulgaris</i>	Wenger_sFGF8	HAAC01005678	www.ebi.ac.uk/ena/data/view
<i>Hydra vulgaris</i>	FGFA_HYDVU	XP_002166704.2	GenBank
<i>Hydra vulgaris</i>	FGFB_HYDVU	XP_002170051.1	GenBank
<i>Hydra vulgaris</i>	FGFC_HYDVU	XP_00216549	GenBank
<i>Hydra vulgaris</i> AEP	FGF-a	HAEP_T-CDS_v02_78	Compagen
<i>Hydra vulgaris</i> AEP	FGF-b	HAEP_T-CDS_v02_10	Compagen
<i>Hydra vulgaris</i> AEP	FGF-c	HAEP_T-CDS_v02_11	Compagen
<i>Hydra vulgaris</i> AEP	FGF-e	HAEP_T-CDS_v02_45	Compagen
<i>Hydra vulgaris</i> AEP	FGF-f	HAEP_T-CDS_v02_48	Compagen
<i>Hydra vulgaris</i> Zürich	HvFGF1/2	CN777327	GenBank
<i>Hydra magnipapillata</i>	FGFA_HYDMA	XP_002164870.1	GenBank

4. 1. 2 Phylogenetische Analyse der *Hydra* FGFs

4. 1. 2. 1 Eingruppierung der *Hydra* FGFs erfolgt in drei der sieben FGF Unterfamilien der Vertebraten

Die Verwendung der für FGFs typischen *Core*-Region führte zur Erzeugung eines stabilen Stammbaumes. Denn die einzelnen FGFs verschiedener Vertebraten werden, mit einer guten Auftrennung (über 50 %) in ihre Unterfamilien gruppiert (Abb. 4.1).

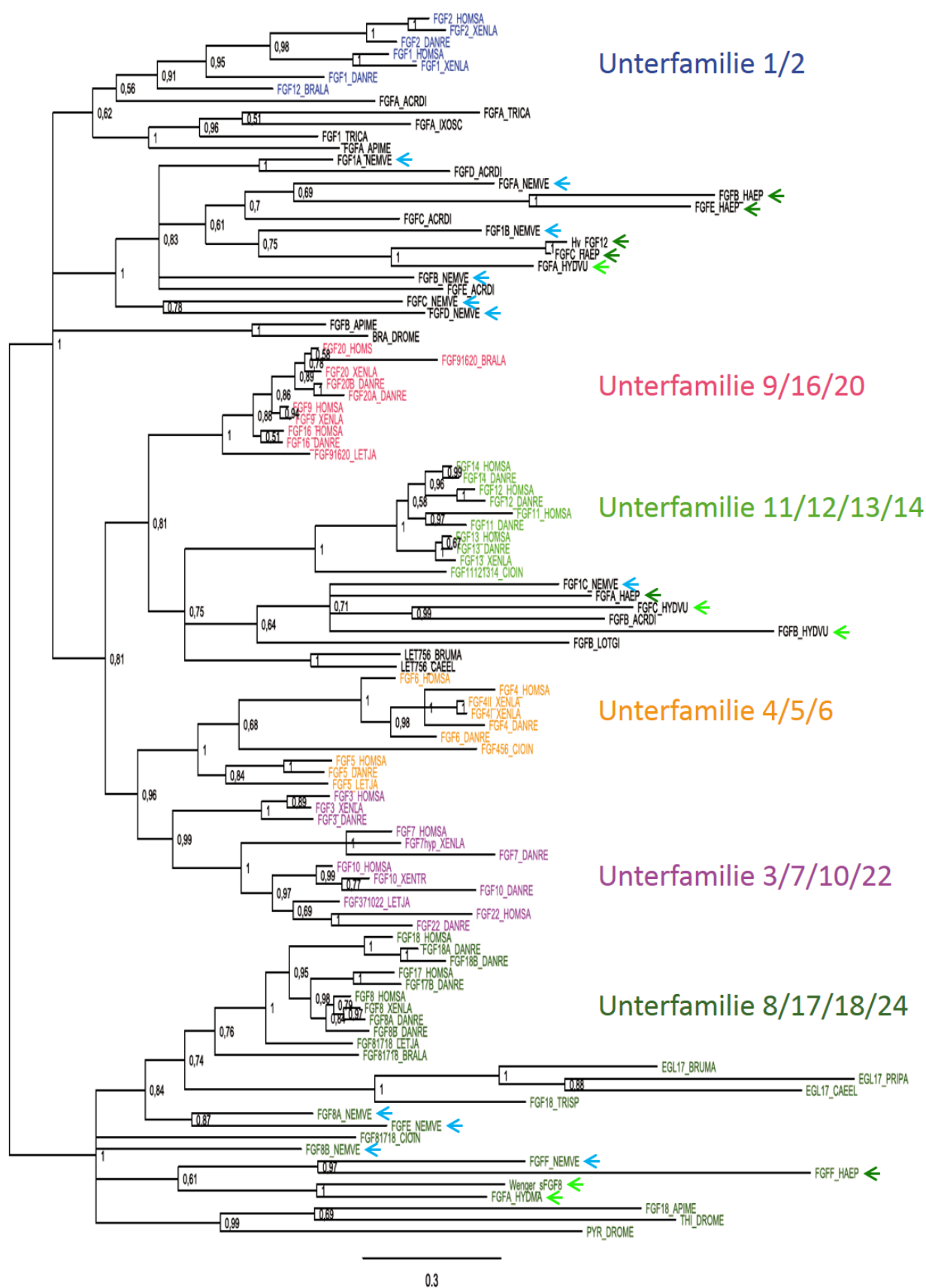
Die phylogenetische Untersuchung für die gefundenen *Hydra* FGFs zeigte, dass sich einige der FGFs gut in die bei Vertebraten bekannten Unterfamilien einordnen lassen (Lange et al., 2014). So werden die FGFs FGf_HAEP, Wenger_sFGF8 und FGFA_HYDMA in die Unterfamilie 8/17/18/24 einsortiert (Abb. 4.1). Die FGFs b_HAEP, c_HAEP, e_HAEP, sowie HvFGF1/2 und FGFA_HYDVU werden mit der FGF1/2 Unterfamilie zusammen gruppiert. FGf_HAEP und die FGFs FGFB_HYDVD und C_HYDVD werden den intrakrinen FGFs 11,12,13,14 zugeordnet. Auch 11 FGFs von *Nematostella vectensis* werden zum einen nahe der Unterfamilie 1/2 und in die Unterfamilie 8/17/18/24 eingruppiert (Abb. 4.1).

▼ Abbildung 4.1: Stammbaum der FGFs basierend auf der *Core*-Region.

HOMSA: *Homo sapiens*, XENLA: *Xenopus laevis*, XENTR: *Xenopus tropicalis*, DANRE: *Danio rerio*, CIOIN: *Ciona intestinalis*, NEMVE: *Nematostella vectensis*, Hv: *Hydra vulgaris* Zürich, HAEP: *Hydra vulgaris* AEP, Wenger: *Hydra vulgaris*, HYDVU: *Hydra vulgaris*, HYDMA: *Hydra magnipapillata*, LOTGI: *Lottia gigantea*, TRICA: *Tribolium castaneum*, IXOSC: *Ixodes scapularis*, APIME: *Apis mellifera*, DROME: *Drosophila melanogaster*, BRUMA: *Brugia malayi*, TRISP: *Trichinella spiralis*, PRIPA: *Pristionchus pacificus*, CAEEL: *Caenorhabditis elegans*, ACRDI: *Acropora digitifera*, LETJA: *Lethenteron japonicum*, BRALA: *Branchiostoma lanceolatum*.

Wurzel des Baumes: Unterfamilie 8/17/18/24, blaue Pfeile: *Nematostella vectensis* FGFs, hellgrüne Pfeile: *Hydra vulgaris* AEP FGFs, dunkelgrüne Pfeile: FGFs anderer *Hydra* Spezies.

[verändert nach Lange et al., 2014]

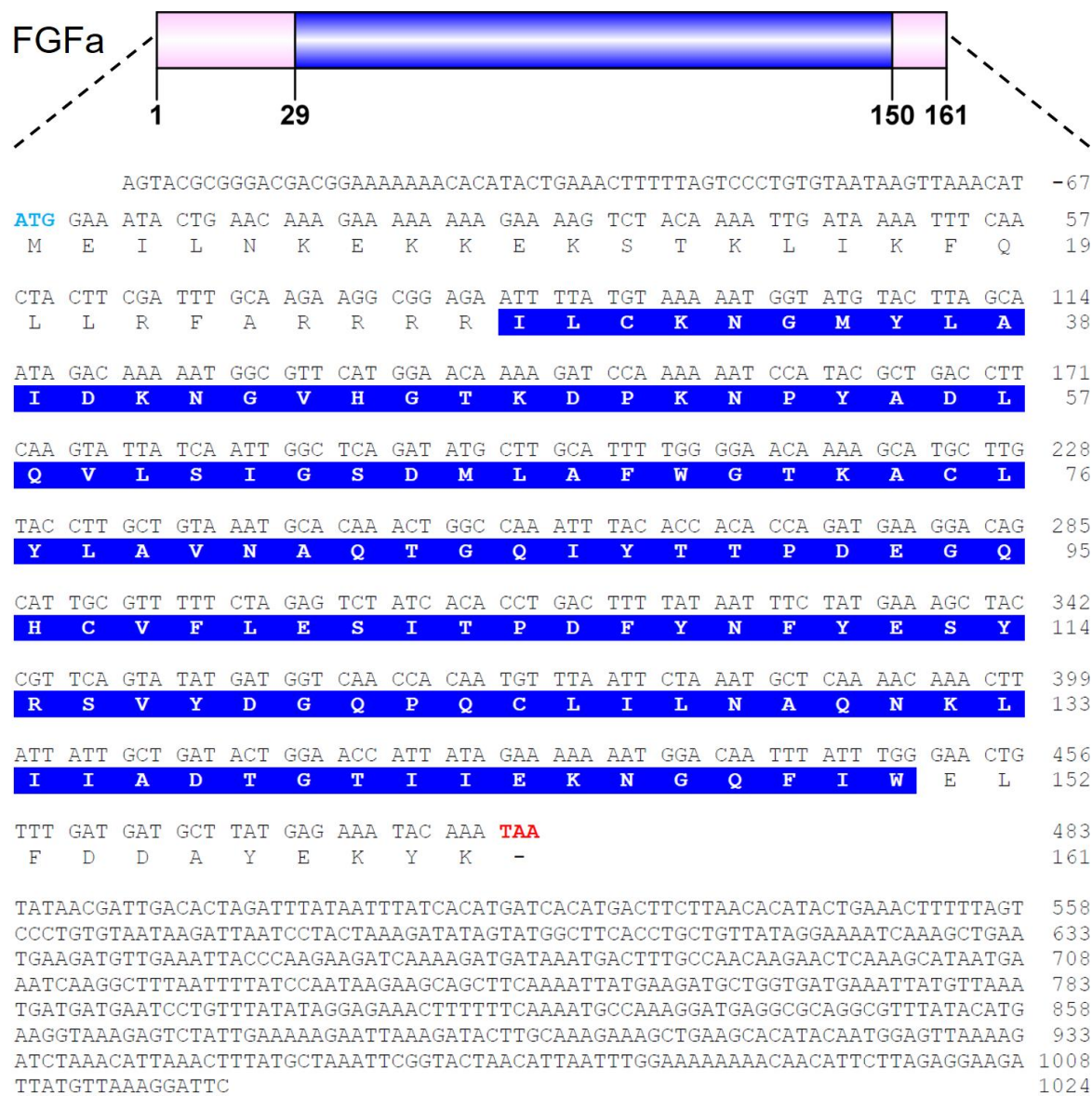


Für eine genauere Untersuchung wurden die FGFs der Art *Hydra vulgaris* AEP verwendet, da diese Art die einzige ist, die man zur Erzeugung transgener Polypen nutzen kann (Wittlieb et al., 2006). Dies ist für die spätere funktionelle Analyse der FGFs wichtig. In den weiteren Beschreibungen werden die FGFa_HAEP, FGFb_HAEP, FGFc_HAEP, FGFe_HAEP FGFe_HAEP mit FGF-a, FGF-b, FGF-c, FGF-e und FGF-f abgekürzt.

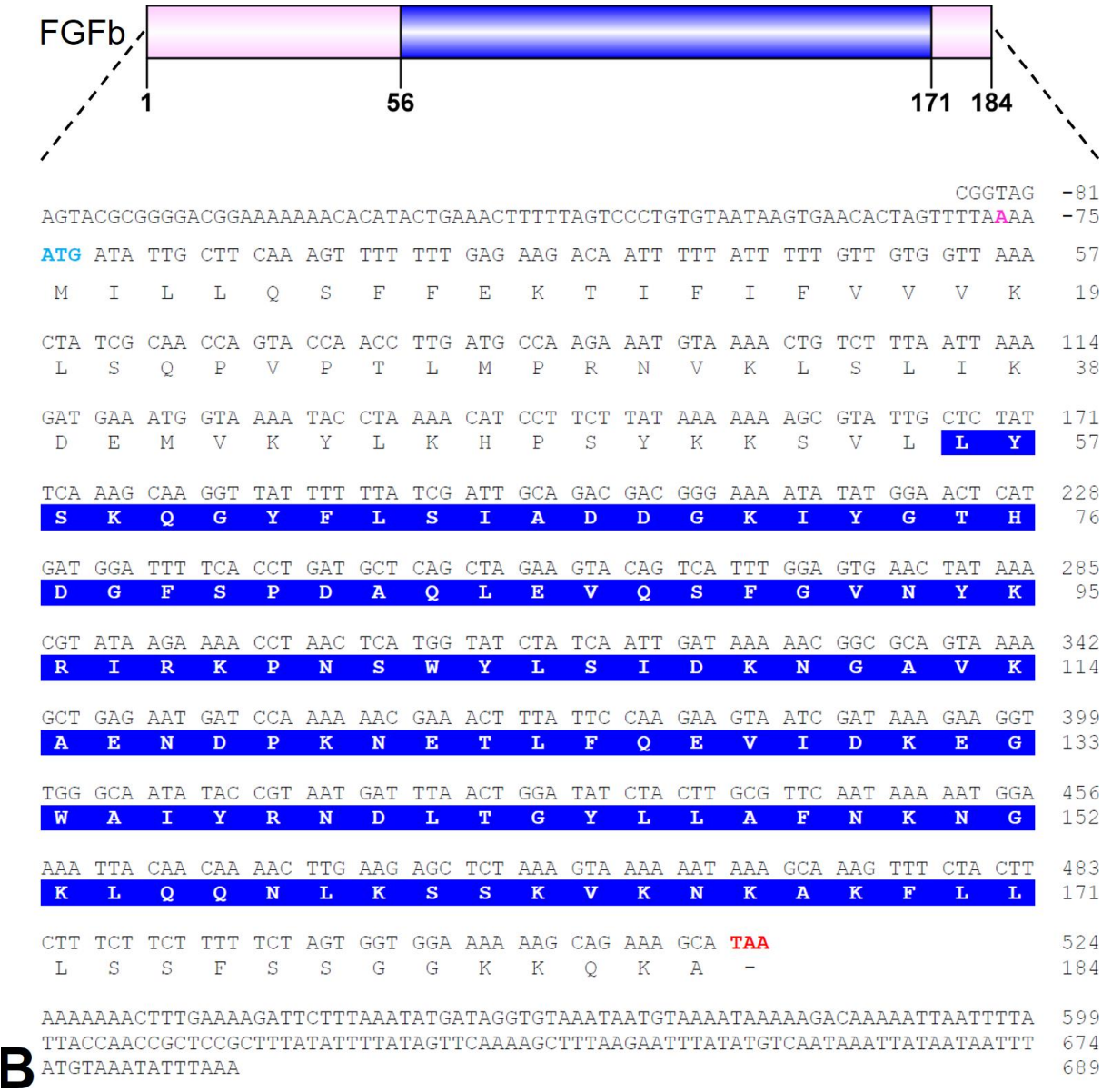
4. 1. 3 Putative Struktur und Eigenschaften der abgeleiteten Proteinsequenzen, aus dem offenen Leseraster (ORF = *open reading frame*) von FGF-a bis FGF-f

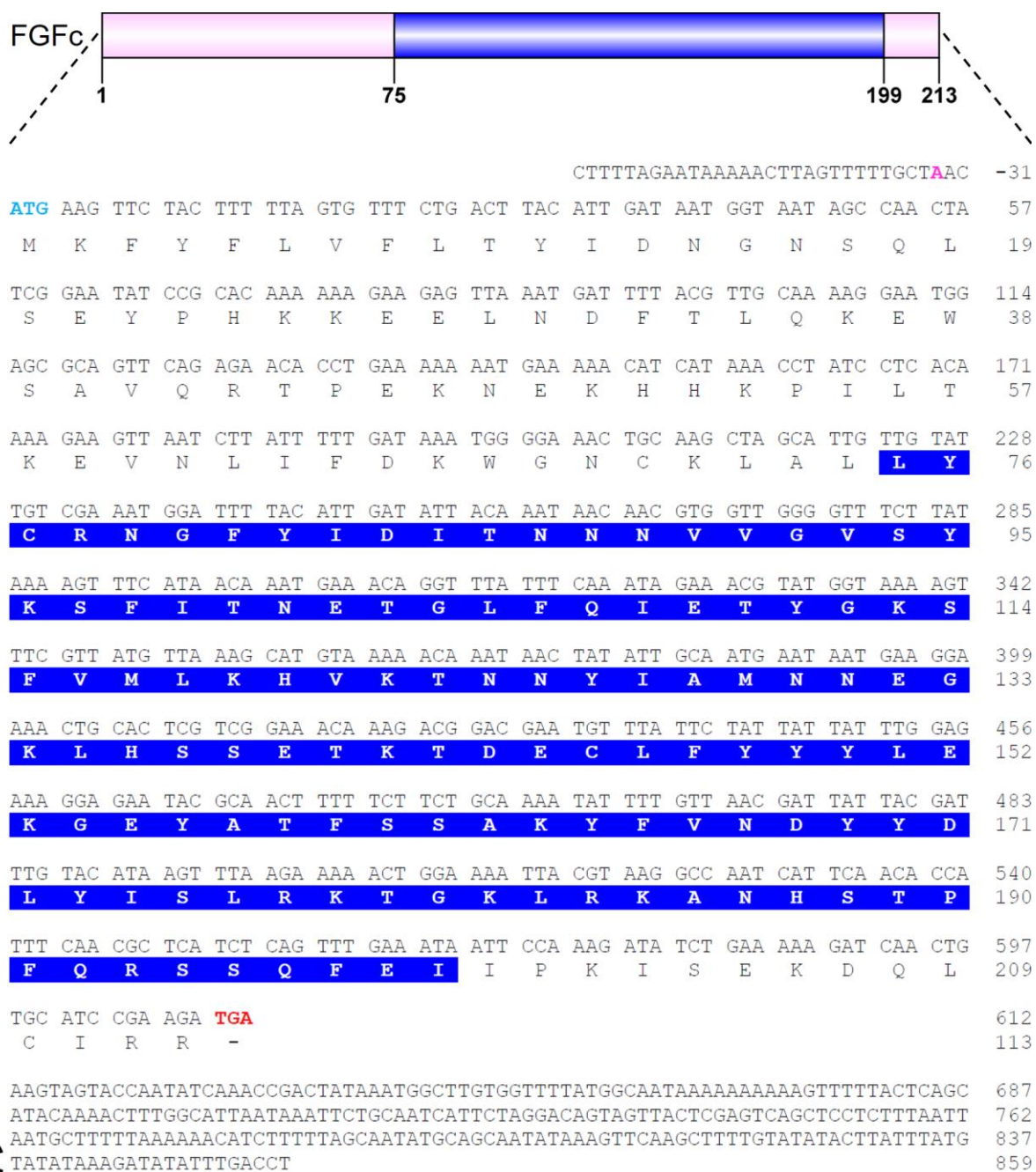
Die Sequenzanalyse der cDNAs von FGF-a, FGF-b, FGF-c, FGF-e und FGF-f zeigte, dass alle ein komplettes Leseraster, mit Start- und Stop-Codon, sowie zum Teil 5' und 3' nichtcodierende Sequenzen enthalten. (Abb. 4.2). Im Falle von FGF-a war das Kozak-Kriterium (in -3 vor dem Start-Codon ein A oder G) für das erste mögliche Start-Codon nicht erfüllt, weshalb die Sequenz möglicherweise 5' unvollständig ist. Bei allen anderen Sequenzen ist das Kozak-Kriterium für das Start-Codon erfüllt (Abb. 4.2).

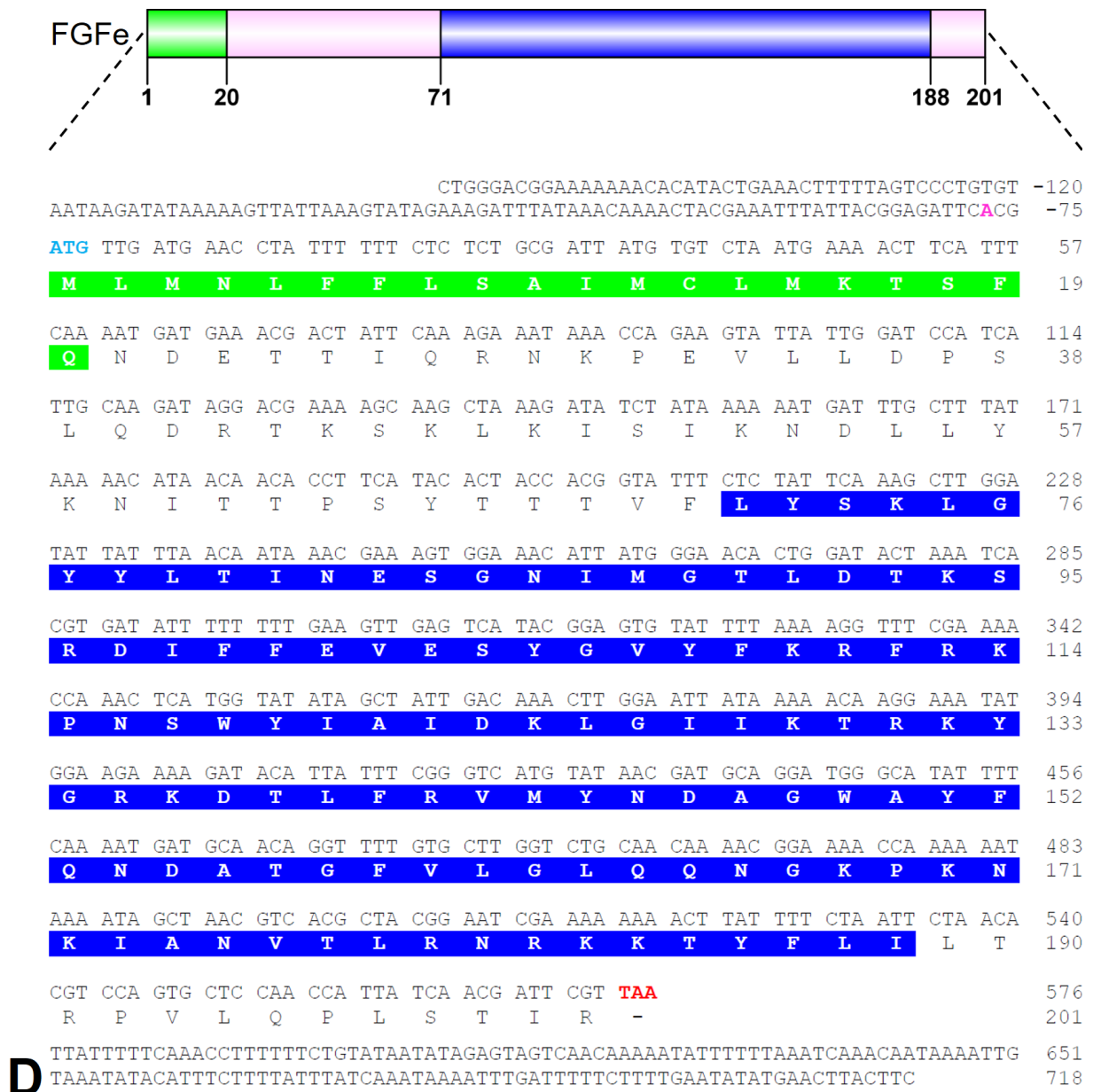
Die Größe der aus dem ORF abgeleiteten FGF Proteinsequenzen liegt zwischen 18,6 kDa und 31,5 kDa (Tab. 4.2). Ihre Länge lag zwischen 161 Aminosäuren (AS) und 274 AS (Tab. 4.2). Sie verfügen alle über die für FGFs typische Core-Region (Abb. 4.2), mit einer Länge zwischen 115 AS und 128 AS (Tab. 4.2). Mittels dreier Programme (Abschnitt 3. 2. 20) wurde untersucht, ob ein Signalpeptid vorhanden ist. Im Falle von FGF-a, FGF-b und FGF-c wurde übereinstimmend vorhergesagt, dass kein Signalpeptid vorhanden ist (Abb. 4.2; Tab. 4.2). Bei FGF-e und FGF-f sagen die Programme SignalP 4.1 Server und Phobius ein Signalpeptid vorher (Abb. 4.2; Tab. 4.2). Das Programm Predisi erkennt zwar kein Signalpeptid, gibt aber eine Schnittstelle an, die mit dem vorhergesagten Signalpeptid der beiden anderen Programme übereinstimmt. Da Signalpeptide meist aus einem Bereich mit hydrophoben Aminosäuren aufgebaut sind, wurden die angegebenen Signalpeptid-Sequenzen auf hydrophobe Aminosäuren hin untersucht (Martoglio und Dobberstein 1998). Die Untersuchung zeigte, dass die angegebenen Bereiche stark hydrophob sind. Daher spricht alles dafür, dass FGF-e und FGF-f ein Signalpeptid zur Sekretion besitzen.



A







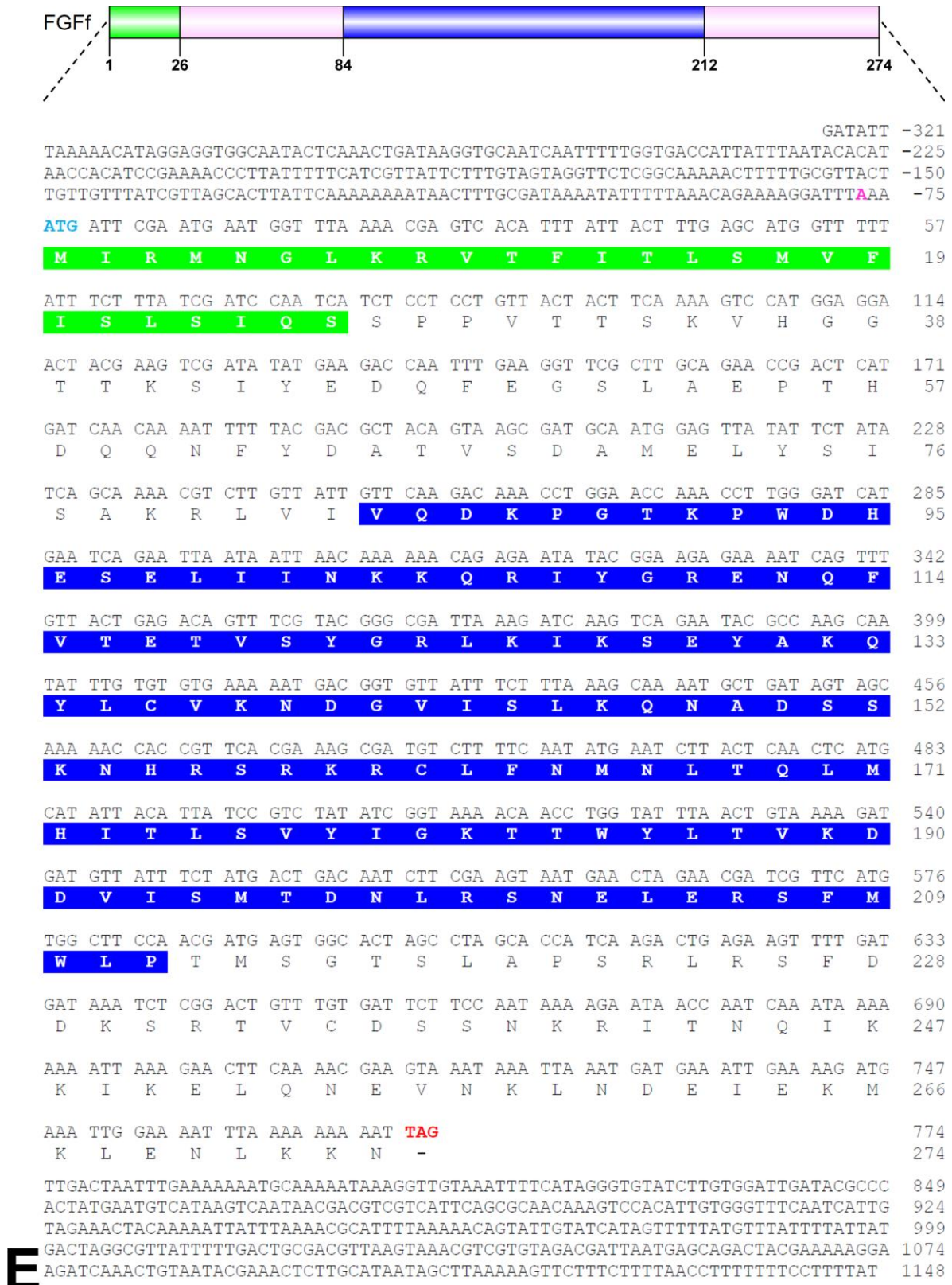


Abbildung 4.2: Nukleotid- und abgeleiteten Proteinsequenzen für die *Hydra vulgaris* AEP FGfs: FGF-a, FGF-b, FGF-c, FGF-e und FGF-f.

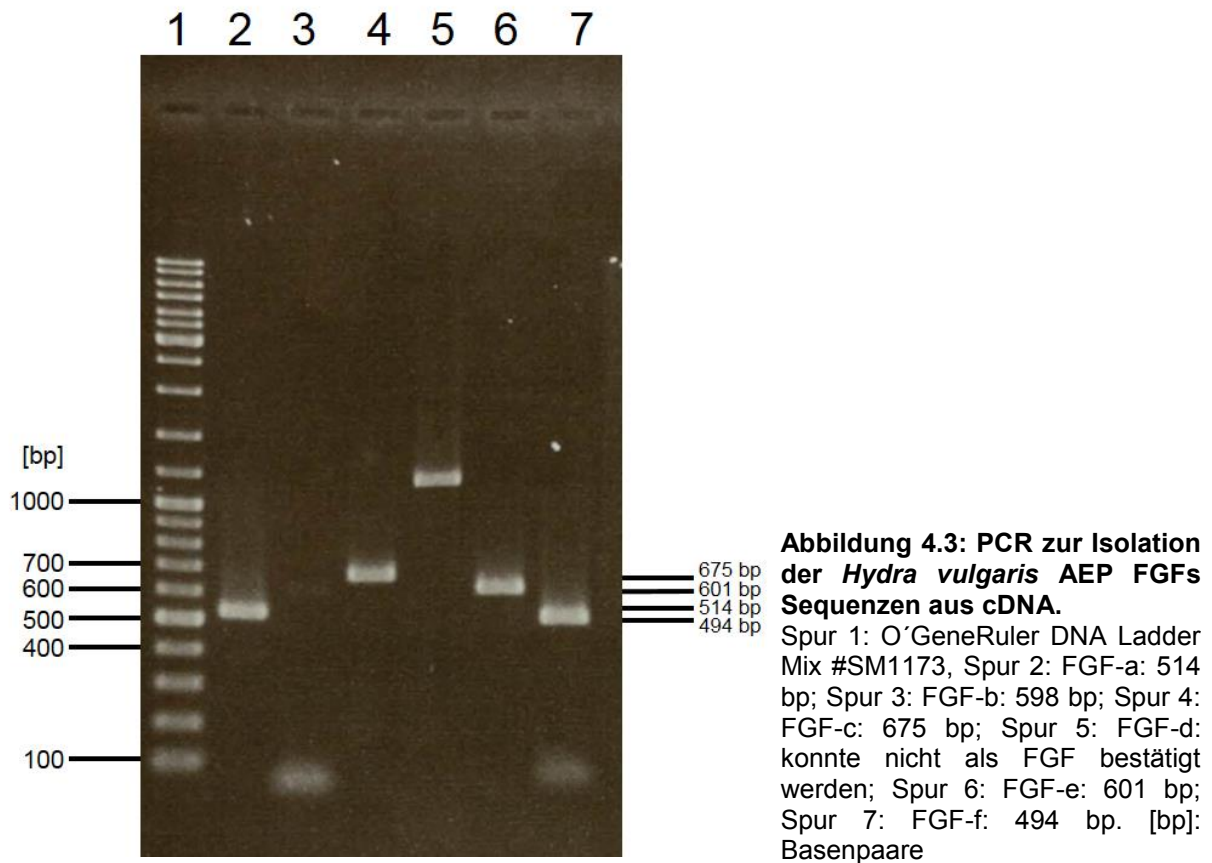
(A) FGF-a. (B) FGF-b. (C) FGF-c. (D) FGF-f. (E) FGF-f. Die Sequenzen enthalten: hellblau: Start-Codon, rot: Stop-Codon, pink: Adenin in -3 vor dem Start-Codon erfüllt Kozak-Kriterium, blau/blau unterlegt: Core-Region, grün/grün unterlegt: Signalpeptid.

Tabelle 4.2: Sequenzdaten der FGFs von *Hydra vulgaris* AEP

Name	Größe/ Länge	Signalpeptid	Länge Core-Region	Anmerkungen
FGF-a	18,6 kDa/ 161 AS	nein	121 AS	Sequenz möglicherweise unvollständig, Kozak-Kriterium nicht erfüllt
FGF-b	20 kDa/ 184 AS	nein	115 AS	Sequenz vollständig Kozak-Kriterium erfüllt
FGF-c	25,2 kDa/ 213 AS	nein	124 AS	Sequenz vollständig Kozak-Kriterium erfüllt
FGF-e	23,4 kDa/ 201 AS	ja MLMNLFFLSAIMCLMKTSFQ	117 AS	Sequenz vollständig Kozak-Kriterium erfüllt
FGF-f	31,5 kDa/ 274 AS	ja MIRMNGLKRVTFITLSMVFISLSIQS	128 AS	Sequenz vollständig Kozak-Kriterium erfüllt

4. 1. 4 Isolation und Klonierung der *Hydra vulgaris* AEP FGFs: FGF-a, FGF-b FGF-c FGF-e FGF-f

Um die vorhergesagten *Hydra* FGF-Sequenzen aus der cDNA von *Hydra vulgaris* AEP zu isolieren, wurden mittels des Primer Design Tools von NCBI geeignete Primer gesucht. Da das *Hydra*-Genom sehr AT reich ist (Chapman et al., 2010), war es schwierig Primer, mit geeigneter Temperatur (etwa 64 °C), zu finden, um die gesamte kodierende Sequenz zu amplifizieren. Daher wurden letztlich Primer verwendet, die den größten Teil der jeweiligen kodierenden Sequenzen umfassten. Mit Ausnahme der FGF-b kodierenden Sequenz konnten die vier anderen FGF kodierenden Sequenzen erfolgreich aus der cDNA isoliert (Abb. 4.3), in pGEM-T Easy kloniert und in *E. coli* DH5 α transformiert werden. Die PCR für FGF-b lieferte nur sehr wenig Material (Abb. 4.3 Spur 3). Das Problem konnte auch nach Re-PCR, Änderungen in der Annealing-Temperatur bzw. *hot-start* PCR nicht beseitigt werden, so dass eine Fokussierung auf die vier anderen FGFs sinnvoller erschien.



4. 1. 5 Verteilung der FGF-Transkripte in *Hydra vulgaris* AEP ist z.T. sehr spezifisch

Die Lokalisierung der FGF-a, FGF-c, FGF-e und FGF-f Transkripte wurde mittels *in situ* Hybridisierung (ISH) analysiert und somit die räumlich-zeitliche Transkription der FGFs sichtbar gemacht. Der Nachweis erfolgte über spezifische antisense RNA-Sonden. Für die Überprüfung der Spezifität der Hybridisierung wurden, als Negativkontrolle die jeweiligen sense RNA-Sonden verwendet.

Die Auswertung der ersten ISHs ergab zunächst nur bei *fgf-f* ein spezifisches Muster. Alle anderen FGF-Gene schienen ubiquitär in der gesamten Körpersäule transkribiert zu werden. Die Erfahrung mit stark transkribierten Genen zeigt, dass eine starke Verdünnung der Sonden meist zu einem spezifischeren Ergebnis führt. Daher wurden die Sonden für die FGFs: FGF-a, FGF-c und FGF-e statt ursprünglich 1:100 1:500 verdünnt. Nach dieser Verdünnung der Sonden zeigten sich auch für diese FGFs spezifische Transkriptionsmuster. Das Testen der neu verdünnten Sonden erfolgte unter meiner Betreuung durch die Bachelorstudenten K. Ohler, K. Adamkiewicz und B. Humburg.

Bei Verwendung der sense RNA-Sonden konnte bei allen FGFs kein Transkript detektiert werden (Daten nicht gezeigt), sodass davon ausgegangen werden kann, dass die mit der antisense RNA-Sonde detektierten Transkriptionsmuster spezifisch sind.

4. 1. 5. 1 *fgf-a*, ein mögliches intrakrines FGF, wurde entlang Tentakel und oberhalb der Basalscheibe transkribiert

fgf-a, welches in die Unterfamilie der intrakrinen FGFs (11-14) eingruppiert wird, zeigte in der ersten ISH zunächst eine ubiquitäre Transkription. Erst durch erneute Verdünnung (1:500) der Sonde konnten zwei Transkriptionsdomänen, ektodermal entlang der Tentakel, dabei verstärkt in den Tentakelspitzen (Abb. 4.4 A) und ektodermal oberhalb der Basalscheibe ringförmig um den Stiel verlaufend, detektiert werden (Abb. 4.4 A, B). Während der Knospung wurde *fgf-a* erst ab Stadium 9 an der Knospenbasis, zum Zeitpunkt der Fuß-Neuausbildung, transkribiert (Abb. 4.4 B-D).



Abbildung 4.4: *fgf-a* Transkription bei einem knospenlosen Polypen und während der Knospung von *Hydra vulgaris* AEP.

(A) *fgf-a* Transkription bei einer adulten *Hydra* ohne Knospe. (B-C) keine *fgf-a* Transkription in der Knospe, während der Initiations- und Elongationsphase der Knospung. (D) Schwache *fgf-a* Transkription an der Knospenbasis einer Stadium 9 Knospe. A-D: Übersichtsaufnahmen, st: Knospenstadium, Maßbalken: 100 µm.

[Einteilung der Knospenstadien nach Otto und Campbell (1967)]

[Präparate: B. Humburg, BSc]

4. 1. 5. 2 *fgf-c* wurde unterhalb der Tentakelbasis und oberhalb der Basalscheibe transkribiert

fgf-c wies, wie *fgf-a*, zwei spezifische Transkriptionsdomänen auf. Es wurde ektodermal, unterhalb der Tentakelbasis, in Form eines Halbkreises (Abb. 4.5 A-B), und, wie *fgf-a*, ringförmig oberhalb der Basalscheibe transkribiert (Abb. 4.5 A, C). Hierbei war zu erkennen, dass bei sehr kurzem Stiel auch der Ring, in dem das Gen transkribiert wurde, sehr schmal war und die Transkription stärker zu sein schien (Abb. 4.6 A, I). Bei einem langen Stiel war der Ring entsprechend breiter und die Transkription erschien schwächer (Abb. 4.6 J,K).

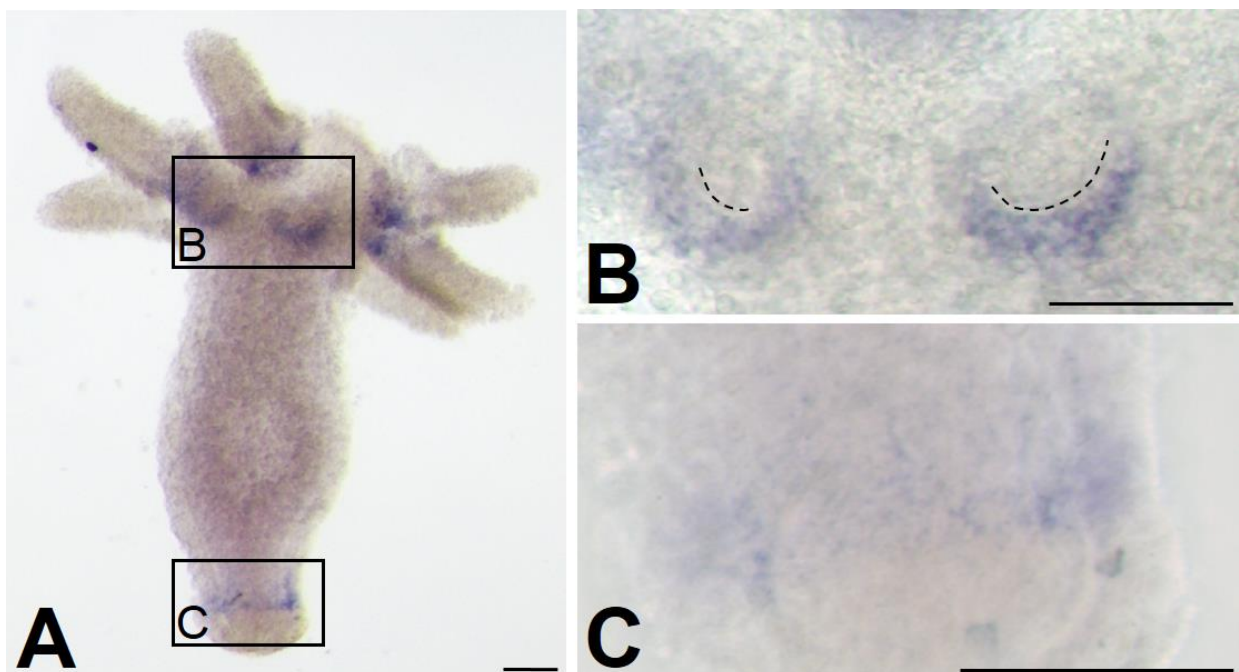


Abbildung 4.5: *fgf-c* Transkription in einer adulten, knospenlosen *Hydra vulgaris* AEP.

(A) *fgf-c* Transkription in einer adulten *Hydra*, ohne Knospe. (B) *fgf-c* Transkription, halbkreisförmig unterhalb der Tentakel. (C) *fgf-c* Transkription oberhalb der Basalscheibe. A: Übersichtsaufnahme, B-C: Detailaufnahme Tentakelbasis und Fuß, gestrichelte Linie: Mesogloea, Maßbalken: 100 µm.

[Präparate: K. Ohler, BSc.]

Während der Knospung wurde *fgf-c* in den frühen Stadien (1 bis 5) nicht transkribiert (Abb. 4.6 A-B, E-F). Erst in der späten Elongationsphase (Stadium 6) war eine ektodermale Transkription, in den sich bildenden Tentakelknospen, zu sehen (Abb. 4.6 C, G). Bereits in Stadium 7-8 mit Auswachsen der Tentakelknospen, glich die Transkription unterhalb der Tentakelbasis der im adulten Tier (Abb. 4.6 D, H) und blieb in dieser Form erhalten (Abb. 4.6 I-N). Mit Erreichen von Stadium 9 wurde auch eine schwache Transkription an der Basis der Knospe sichtbar (Abb. 4.6 J,M). Diese zog sich asymmetrisch von der Oberseite der Basis

Richtung Basalscheibe des Elterntiers (Abb. 4.6 J, M). In Stadium 10 war der Ring oberhalb der Basalscheibe geschlossen (Abb. 4.6 K, N).

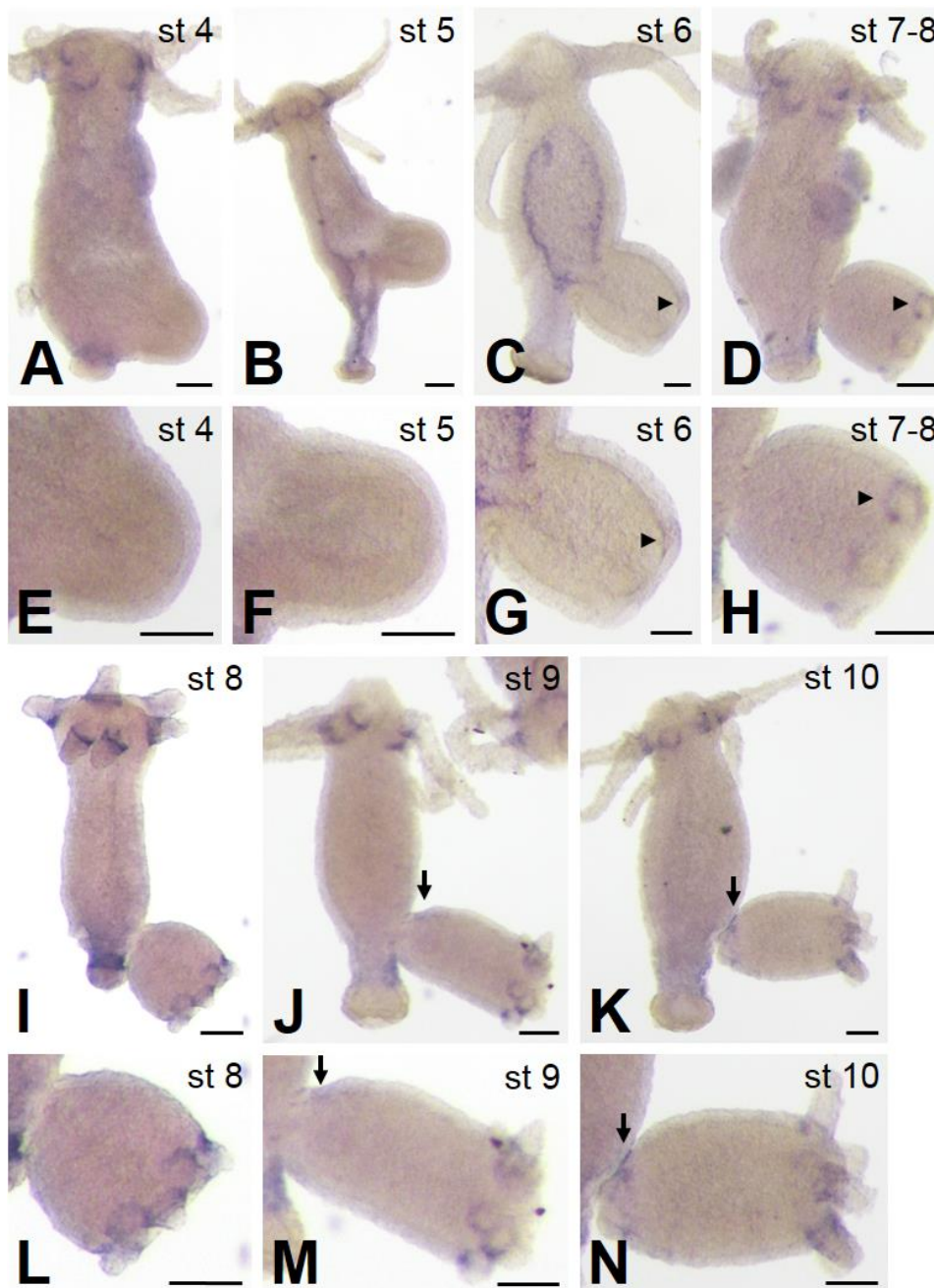


Abbildung 4.6: *fgf-c* Transkription während der Knospung von *Hydra vulgaris* AEP.

(A-B, E-F) Keine *fgf-c* Transkription bis einschließlich Knospenstadium 5. (C, G) Erste schwache Transkription von *fgf-c* mit Entstehung der Tentakelknospen. (D,H-I,L) *fgf-c* Transkription halbkreisförmig unterhalb der Tentakel. (J-K, M-N) Zusätzliche *fgf-c* Transkription an der Knospenbasis. A-D, I-K: Übersichtsaufnahmen, E-H, L-N: Detailaufnahme Knospe.

st: Knospenstadium, schwarze Pfeilköpfe: Transkription an der Tentakelbasis, schwarze Pfeile: *fgf-c* Transkription an der Knospenbasis, Maßbalken: 100 µm.

[Einteilung der Knospenstadien nach Otto und Campbell (1967)]

[Präparate A-B, D-K: K. Ohler, BSc]

4. 1. 5. 3 *fgf-e* wurde im adulten Tieren und während des gesamten Vorgangs der Knospung transkribiert

fgf-e wurde, ähnlich wie *fgf-a* und *fgf-c*, im knospenlosen Tier ektodermal oberhalb der Basalscheibe im Stiel transkribiert (Abb. 4.7 A, B). Im Vergleich zu *fgf-a* und *fgf-c*, ist der Bereich der Transkription breiter und scheint in gesamten Stiel vorhanden zu sein.

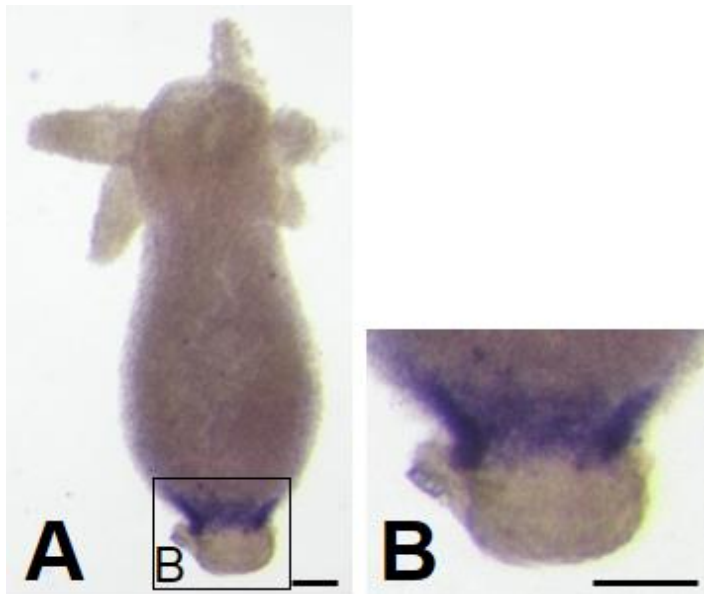


Abbildung 4.7: *fgf-e* Transkription bei einer adulten knospenlosen *Hydra vulgaris* AEP.

(A) *fgf-e* Transkription in einer adulten *Hydra* ohne Knospe. (B) *fgf-e* Transkription im Stiel von *Hydra*. A: Übersichtsaufnahme, B: Detailaufnahme Stiel und Basalscheibe, Maßbalken: 100 µm.

Während der Knospung war die Transkription von *fgf-e* bereits ab dem ersten Stadium detektierbar. Es wurde ektodermal im Bereich der neuen Knospe transkribiert (Abb. 4.8 A, G). In den Stadien 3 und 4 befand sich die mRNA nur an der Spitze der Knospe, im späteren Bereich des Hypostoms, (Abb. 4.8 B-E, H-K). Beim Übergang von Stadium 4 zu 5 wurde *fgf-e* zusätzlich an der Knospenbasis transkribiert (Abb. 4.8 E-F, K-L). Wobei nicht auszumachen war, wo die Grenze zwischen Transkription an der Basis der Knospe und mRNA im Stiel. In Stadium 5 und 6 war die Transkription an der Spitze der Knospe breiter und stärker als in den vorherigen Stadien (Abb. 4.8 F, L-M, S). Mit Stadium 6 hob sich das Transkript an der Knospenbasis deutlich von dem in Stiel ab (Abb. 4.8 M, S). Ab Stadium 7 wurde keine mRNA in der Knospenspitze mehr detektiert (Abb. 4.8 N-R, T-X). Im achten Stadium verlief der Ring an der Knospenbasis, der jetzt schmaler war, um die gesamte Basis der Knospe (Abb. 4.8 P, V). Mit Ausbildung der Basalscheibe in Stadium 9 war bei der Knospe eine *fgf-e* Transkription oberhalb der Basalscheibe sichtbar (Abb. 4.8 Q, W). Diese verlief, wie bei *fgf-c*, asymmetrisch von der Oberseite der Knospenbasis in Richtung Unterseite. In Stadium 10 war die Transkription von *fgf-e* auf den Bereich beschränkt, in dem

das Elterntier und die Knospe miteinander verbunden waren (Abb. 4.8 R, X). Nach der Ablösung der Knospe blieb ein kleiner Ring von *fgf-e* positiven Zellen im Elterntier vorhanden (Abb. 4.8 P, V, Stern). Des Weiteren war zu sehen, dass die Transkription oberhalb der Basalscheibe im Elterntier während der Knospung stark variiert (Abb. 4.8). Zu Beginn der Knospung bis Stadium 3-4, war die Transkription auf den Stiel beschränkt (Abb. 4.8 A-D). In Stadium 4 bis Stadium 6 verschob sich die Transkription bis in die Knospungszone und die Gastralregion (Abb. 4.8 E, F, M). Bei Stadium 7 und 7-8 war die Transkription wieder auf den Stiel beschränkt (Abb. 4.8 N, O). In Stadium 8 schien sie komplett verschwunden und in Stadium 9 und 10 reichte sie wieder bis in die Knospungszone (Abb. 4.8 P-R).

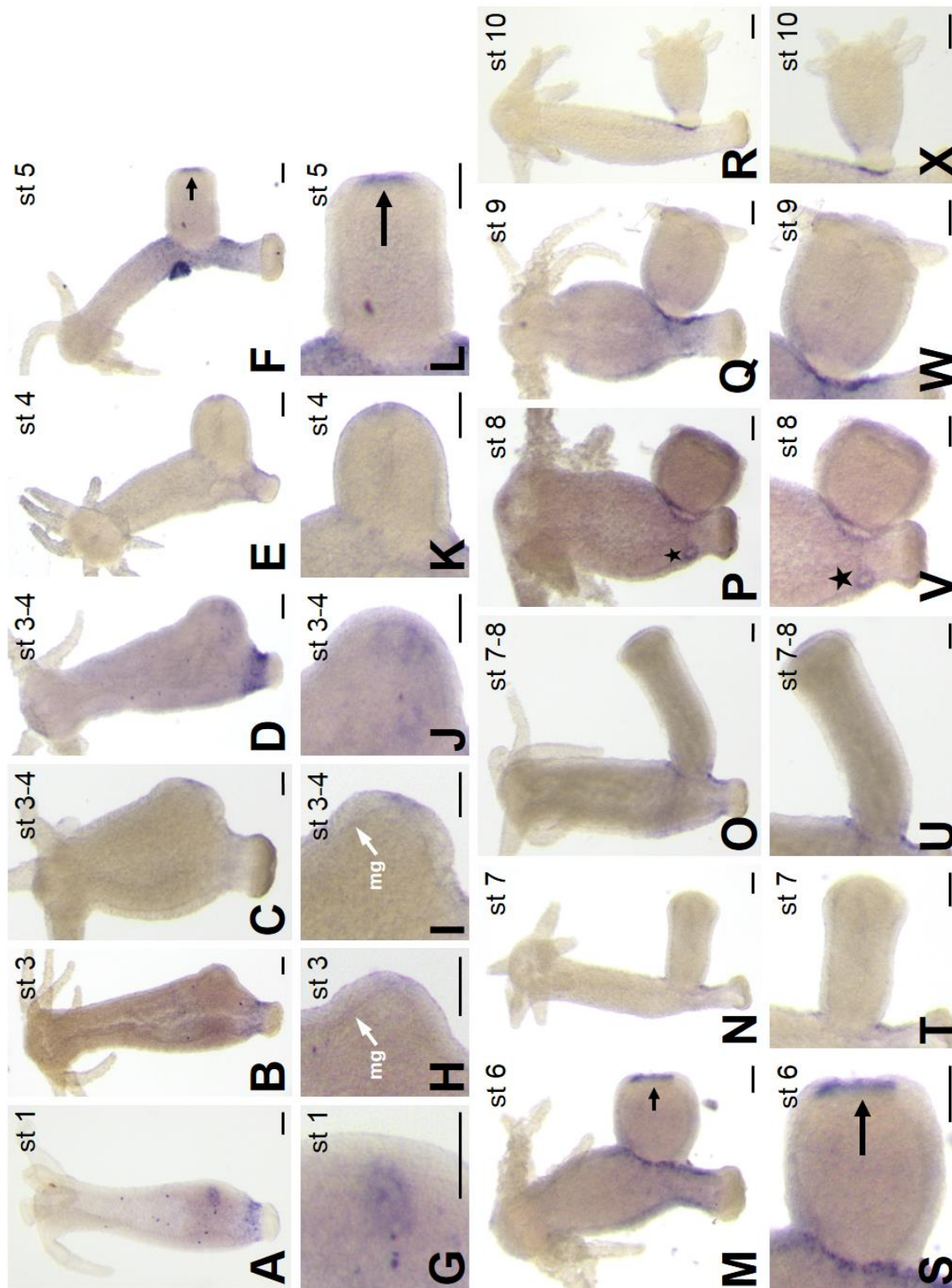


Abbildung 4.8: *fgf-e* Transkription während der Knospung von *Hydra vulgaris* AEP.

(A-D, G-J) *fgf-e* Transkription während der Initiationsphase der Knospung. (E-F, K-O, S-U) *fgf-e* Transkription während der Elongationsphase der Knospung. (P-R, V-X) *fgf-e* Transkription während der Ablösungsphase der Knospung. A-F, M-R: Übersichtsaufnahmen, G-L, S-X: Detailaufnahmen Knospe, st: Knospenstadium, mg: Mesogloea, Stern: Knospenablösestelle, schwarze Pfeile: Transkription im Hypostom, Maßbalken: 100 µm.

[Einteilung der Knospenstadien nach Otto und Campbell (1967)]

[Präparate: K. Ohler, BSc]

4. 1. 5. 4. 1 *fgf-f* wird an allen morphologischen Grenzen und Körperenden von *Hydra vulgaris* AEP transkribiert

Knospenlose Polypen der Art *Hydra vulgaris* AEP wiesen eine starke entodermale Transkription von *fgf-f* in den Tentakelspitzen und in der Basalscheibe auf (Abb. 4.9 A-C). Zudem waren sehr schwache entodermale Transkriptionsdomänen im Bereich des Hypostoms und an der Tentakelbasis zu sehen (Abb. 4.10 A).

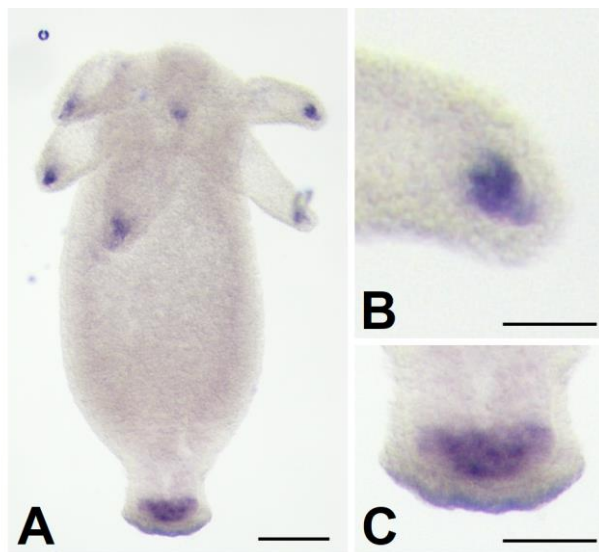


Abbildung 4.9: *fgf-f* Transkription in einer adulten, knospenlosen *Hydra vulgaris* AEP.

(A) *fgf-f* Transkription in einer adulten *Hydra* ohne Knospe. (B) Transkription entodermal in der Tentakelspitze. (C) *fgf-f* Transkription entodermal in der Basalscheibe. A: Übersichtsaufnahme, B-C: Detailaufnahme Tentakelspitze und Fuß, Maßbalken: A: 100 µm; B, C: 50 µm.

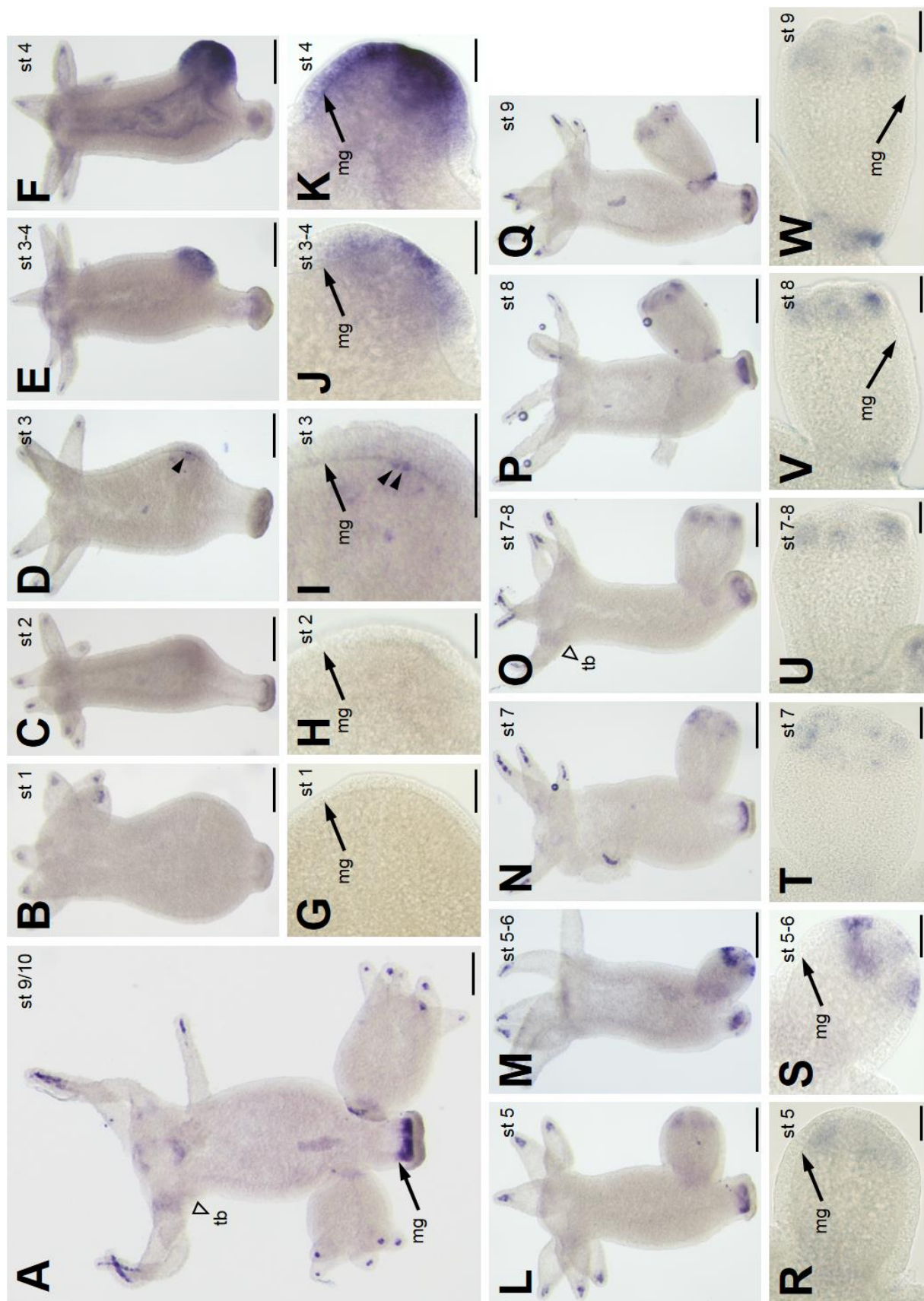
Während der Knospung wurde *fgf-f* dynamisch transkribiert. Zu Beginn der Knospung (Stadium 1-2) war bei der sich bildenden Knospe keine Transkription detektierbar (Abb. 4.10 B-C, G-H). Ab Stadium 3 wiesen einige ektodermale Zellen die mRNA auf (Abb. 4.10 D, I, schwarze Pfeilköpfe). Während des Übergangs von Stadium 3 zu Stadium 4 und im 4. Stadium wurde *fgf-f* ektodermal in der gesamten Knospe transkribiert, wobei die Stärke der Transkription von der Knospenspitze zur Knospenbasis hin abnahm (Abb. 4.10 E-F, J-K). In Stadium 5 bzw. frühen Stadium 6, kurz bevor sich die ersten Tentakelknospen bilden, zerfiel der Bereich der Transkription in einzelne Flecken (Abb. 4.10 L-M, R-S). Mit fortschreitender Entwicklung (Stadium 7, 7-8) wurden die Flecken immer kleiner und lokalisierter (Abb. 4.10 N-O, T-U). Mit Evagination der Tentakelknospen wurde erkennbar, dass die Transkription nicht mehr nur ektodermal, sondern auch entodermal in den Tentakelknospen vorhanden war (Abb. 4.10 O, U). Beim Auswachsen der Tentakel (Stadium 8) wurde keine ektodermale Transkription in den Tentakeln mehr detektiert (Abb. 4.10 P, V). Die mRNA von *fgf-f* konnte nur noch entodermal in den Tentakelspitzen nachgewiesen werden (Abb. 4.10 P, V). Diese

Transkription blieb erhalten. In der Elongationsphase konnte eine neue ektodermale Transkriptionsdomäne an der Basis der Knospe detektiert werden. Diese war in Stadium 5 nur sehr schwach, nahm aber bis Stadium 9 (Ablösungsphase) an Intensität zu (Abb. 4.10 L-W). Zudem zeigte sich in Stadium 8 eine Asymmetrie in dieser Transkription. Sie war an der Unterseite der Knospenbasis stärker und wurde zur Oberseite hin schwächer (Abb. 4.10 P-Q, V-W). Kurz vor der Ablösung der Knospe (Stadium 10) wies die Knospe die gleichen Transkriptionsbereiche, wie ein adulter Polyp auf (Abb. 4.10 A). Das heißt, die bis einschließlich Stadium 9 an der Knospenbasis vorhandene ektodermale Transkription, war verschwunden, dafür konnte nun das Transkript von *fgf-f* entodermal in der Basalscheibe detektiert werden (Abb. 4.10 A).

▼Abbildung 4.10: Dynamische Transkription von *fgf-f* während der Knospung von *Hydra vulgaris* AEP.

(A) *fgf-f* Transkription in einer adulten *Hydra* mit zwei Knospen, eine im Stadium 9 und eine in Stadium 10. (B-K) *fgf-f* Transkription während der Initiations- und zu Beginn der Elongationsphase der Knospung. (L-W) *fgf-f* Transkription während der Elongations- und Ablösungsphase der Knospung. A-F, L-Q: Übersichtsaufnahmen, G-K, R-W: Detailaufnahmen Knospe, mg, schwarzer Pfeil: Mesogloea, st: Knospenstadium, tb, schwarz-weißer Pfeilkopf: Tentakelbasis, schwarze Pfeilköpfe: einzelne *fgf-f* transkribierende Zellen, Maßbalken: A-F, I, L-Q: 250 µm; G-H, J-K, R-W: 100 µm.

[Einteilung der Knospenstadien nach Otto und Campbell (1967)]



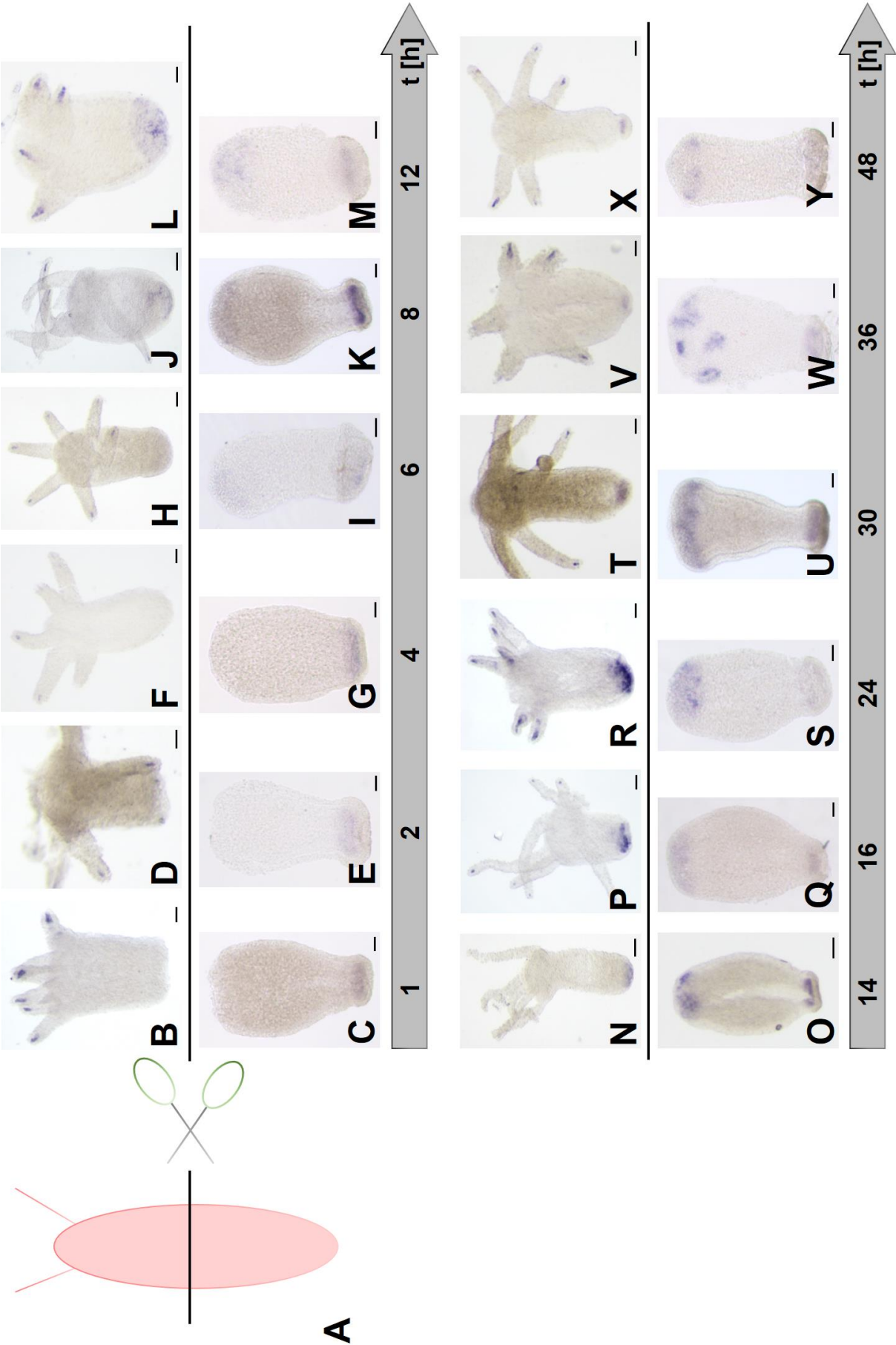
4. 1. 5. 4. 2 *fgf-f* wird während der Regeneration von Kopf und Fuß erst spät transkribiert

Für die Untersuchung der *fgf-f* Transkription während der Regeneration wurden knospenlose Tiere bei 50 % Körperlänge geschnitten (Abb. 4.11 A) und anschließend nach einer Regenerationszeit von einer Stunde bis 48 h fixiert (Abb. 4.11 graue Pfeile). Die Regenerate wiesen zunächst alle die jeweiligen Transkriptionsdomänen entodermal in den Tentakelspitzen bzw. in der Basalscheibe auf (je nach Art des Regenerats) (Abb. 11 B-Y).

Die Transkription des Gens an der Schnittkante begann sowohl bei den Kopf-, als auch bei den Fußregeneraten, bei etwa 6-8 h Regenerationszeit (Abb. 4.11 B-K). Ab diesem Zeitpunkt war eine schwache ektodermale Transkription an der jeweiligen Regenerationsstelle sichtbar (Abb. 4.11 B-K). Die *fgf-f* positiven Zellen bildeten dabei eine Kappe über den regenerierenden Enden.

Nach 12 h Kopfregeneration wurden innerhalb der *fgf-f* mRNA positiven Zellen kleine Bereiche erkennbar, die mehr Transkript enthielten (Abb. 4.11 M). Zwischen 14-24 h Kopfregeneration war die Transkription innerhalb der Regenerate sehr dynamisch und variabel (Abb. 4.11 O, Q, S). Bei 14 h war die starke Transkription bei einigen Regeneraten nur noch unregelmäßig verteilt (Abb. 4.11 O), während bei anderen nur die ursprüngliche Kappe mit wenig mRNA enthaltenden Zellen vorhanden war. Nach 16 h waren die einzelnen Domänen der Transkription verschwunden und es war nur noch eine gleichmäßige Transkription an den Regenerationsstellen vorhanden (Abb. 4.11 Q). Bei 24 h Regenerationszeit waren innerhalb der Transkriptionsdomäne wieder kleine Bereiche zu erkennen, die *fgf-f* stärker transkribierten (Abb. 4.11 S). Nach 30 h Kopfregeneration waren die einzelnen Bereiche mit stärkerer Transkription nicht mehr erkennbar und die Transkription war insgesamt etwas stärker geworden (Abb. 4.11 U). Bei 36 h Regenerationszeit konnten nur noch einzelne, in einem Ring angeordnete, *fgf-f* mRNA positive Bereiche detektiert werden (Abb. 4.11 W). Nach 48 h war, statt der ektodermalen Transkription, nur noch eine schwache entodermale Transkription in den gebildeten Tentakelknospen vorhanden (Abb. 4.11 Y).

Bei der Fußregeneration nahm die Transkription zwischen 12 bis 24 h zu, wobei sich der Bereich der Transkription etwas verkleinerte (Abb. 4.11 L, N, P, R). Ein Vergleich der Regeneration von Kopf und Fuß zeigt, dass die Transkription zu diesen Zeitpunkten bei der Fußregeneration stärker war als bei der Kopfregeneration (Abb. 4.11 L-S). Nach 30 h Fuß-Regenerationszeit beschränkte sich die ektodermale Transkription von *fgf-f* auf den jetzt sichtbaren Ansatz der Basalscheibe (Abb. 4.11 T). Bei 36-48 h Regenerationszeit war die ektodermale Transkription verschwunden und die entodermale Transkription, wie bei einem normalen adulten Polypen, vorhanden (Abb. 4.11 V, X).



▲ Abbildung 4.11: *fgf-f* Transkription während der Regeneration von Kopf bzw. Fuß bei *Hydra vulgaris* AEP.

(A) Schema zur Herstellung der Regenerate. (B, D, F, H, J, L, N, P, R, T, V, X): *fgf-f* Transkription während der Fußregeneration, geschnitten bei 50 % Körperlänge. (C, E, G, I, K, M, O, Q, S, U, W, Y): *fgf-f* Transkription während der Kopfregeneration, geschnitten bei 50 % Körperlänge. graue Pfeile: Zeitskala mit der jeweilige Regenerationszeit (t) in Stunden (h). B-Y: Übersichtsaufnahmen, Maßbalken: 100 µm.

4. 1. 5. 4. 3 Transkription von *fgf-f* weist Unterschiede zwischen *Hydra vulgaris* AEP und *Hydra vulgaris* Zürich auf

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass es zwischen den nahe verwandten Hydren *Hydra vulgaris* Zürich und *Hydra magnipapillata* Unterschiede z. B. in der Expression von PKC gibt (Hassel, 1998).

Um herauszufinden, ob es in der Transkription von *fgf-f* bei *Hydra vulgaris* AEP und *Hydra vulgaris* Zürich Unterschiede gibt, wurde die Transkription von *fgf-f* auch bei *Hydra vulgaris* Zürich mittels ISH untersucht.

Die Transkriptionsdomänen von *fgf-f* bei *Hydra vulgaris* Zürich entsprachen denen von *Hydra vulgaris* AEP, jedoch war die Transkription in den jeweiligen Bereichen sehr viel stärker (Abb. 4.12). Es waren deutlich die Transkriptionsdomänen am Hypostom und an der Tentakelbasis, sowohl beim Elterntier, als auch bei der Knospe, zu erkennen (Abb. 4.12 A-C). Oberhalb der Basalscheibe gab es zusätzlich eine schwache ektodermale Transkription in Form eines Rings (Abb. 4.12 A). Außerdem konnte bereits in Stadium 1-2 der Knospung ein Bereich von *fgf-f* transkribierende Zellen detektiert werden (Abb. 4.12 A, D). Die Transkription an der Knospenbasis in Stadium 8 war im Vergleich zur Transkription bei *Hydra vulgaris* AEP bereits ein geschlossener Ring (Abb. 4.12 A-B).

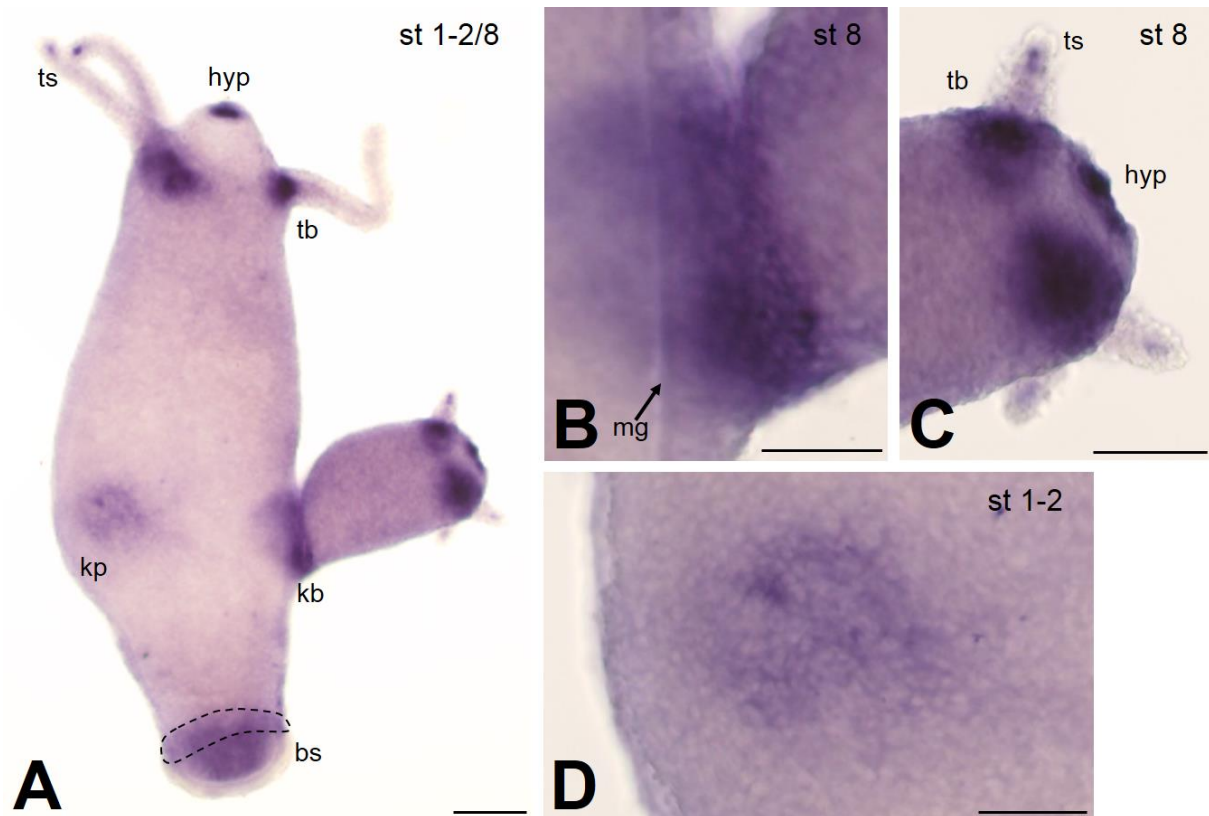


Abbildung 4.12: Transkriptionsmuster von *fgf-f* bei *Hydra vulgaris* Zürich.

(A) *fgf-f* Transkription in einem adulten Polyp mit einer Knospe in Stadium 1-2 und Stadium 8. (B) *fgf-f* Transkription an der Knospenbasis einer Knospe in Stadium 8. (C) *fgf-f* Transkription im Kopfbereich einer Knospe in Stadium 8. (D) *fgf-f* Transkription während der Initiationsphase der Knospung. bs: Basalscheibe, hyp: Hypostom, kb: Knospenbasis, kp: Knospenplakode, mg: Mesogloea, st: Knospenstadium, tb: Tentakelbasis, ts: Tentakelspitze, gestrichelte Linie: ektodermale Transkription oberhalb der Basalscheibe. A: Übersichtsaufnahme, B-C: Detailaufnahme Knospenbasis (st 8) und Knospenkopf (st 8), D: Detailaufnahme Knospenplakode (st 1-2), Maßbalken: A, C-D: 100 µm, B: 50 µm.

[Einteilung der Knospenstadien nach Otto und Campbell (1967)]

4. 1. 5. 5 Transkription von *fgf-c*, *fgf-e* und *fgf-f* in der Testes von *Hydra vulgaris* AEP

In Bezug auf die Transkription der *fgfs* wurden auch sich sexuell fortpflanzende Tiere untersucht, denn sowohl bei der Ausbildung von Testes, als auch für die Entstehung eines Eies, müssen Zellen angelockt und neue Grenzen geschaffen werden und Zellen müssen sich differenzieren. Dies sind Funktionen, die FGFs zugeschrieben werden. Da männliche Hydren leichter und in größerer Zahl zubekommen sind, wurden diese für die Untersuchung der FGF Transkription bei sich geschlechtlich fortpflanzenden Tieren verwendet. Die Gene der FGFs *fgf-c*, *fgf-e* und *fgf-f* wiesen bei der Analyse der Testes sehr spezifisches Muster auf.

4. 1. 5. 5. 1 schwache *fgf-c* Transkription in der Testes von *Hydra vulgaris* AEP

Im Falle männlicher Hydren wiesen die Testes im Vergleich zur Tentakelbasis nur eine schwache *fgf-c* Transkription auf (Abb. 4.13 A). Die Transkription war nicht klar abgegrenzt, sondern wirkte diffus und wurde von proximal zu distal immer schwächer, und reichte etwa bis zu Mitte der Testes (Abb. 4.13 B).



Abbildung 4.13: *fgf-c* Transkription in der Testes von *Hydra vulgaris* AEP.

(A) *fgf-c* Transkription kurz von Abschluss der Testesentwicklung. (B) *fgf-c* Transkription schwach an der Basis der Testes in ektodermalen Epithelzellen. A: Übersichtsaufnahme, B: Detailaufnahme Testes, Maßbalken: A: 100 µm, B: 50 µm.

[Präparat: K. Ohler, BSc.]

4. 1. 5. 5. 2 *fgf-e* wird zu Beginn und gegen Ende der Testesentwicklung transkribiert

In einem frühen Stadium der Testesentwicklung, bevor sich ein Lumen im Inneren gebildet hatte, wurde *fgf-e* in ektodermalen Epithelzellen der Testes transkribiert. Dabei war die Transkription im oberen Bereich der Testes stärker als im unteren Bereich (Abb. 4.14 A, A'). Als die Entwicklung der Testes fast abgeschlossen war, wurde *fgf-e* nur noch apikal-distal in einem kleinen Bereich transkribiert (Abb. 4.14 B, B').

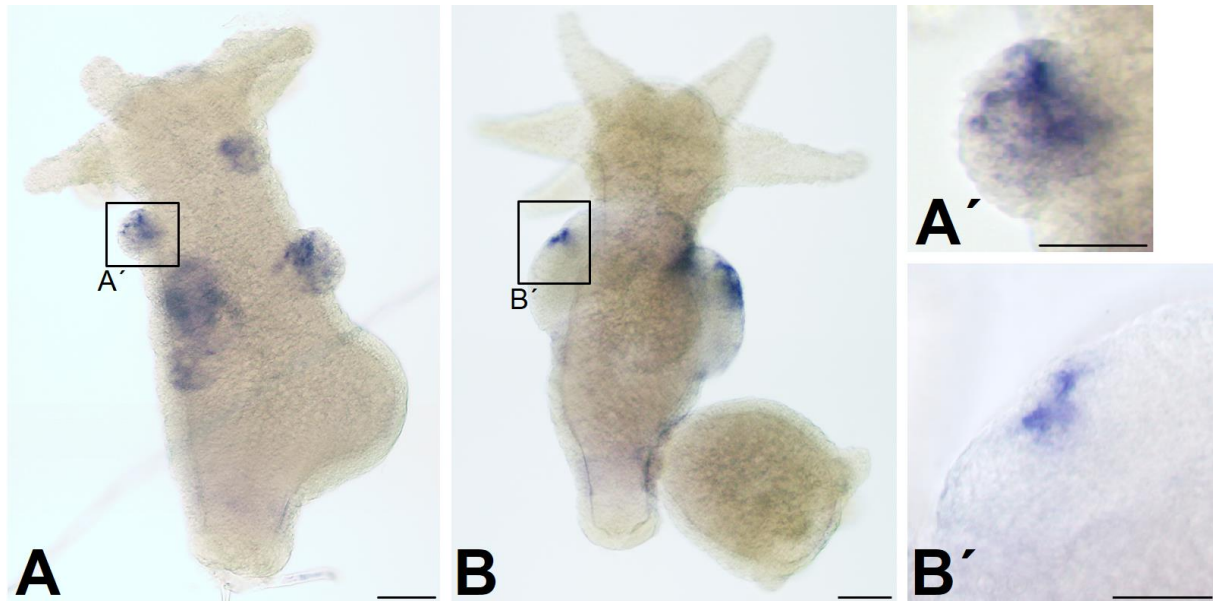


Abbildung 4.14: *fgf-e* Transkription in der Testes von *Hydra vulgaris* AEP.

(A) *fgf-e* Transkription zu Beginn der Testesentwicklung. (A') *fgf-e* Transkription vor allem in apikalen ektodermalen Epithelzellen der Testes. (B) *fgf-e* Transkription kurz von Abschluss der Testesentwicklung. (B') *fgf-e* Transkription in wenigen apikalen ektodermalen Epithelzellen der Testes. A-B: Übersichtsaufnahmen, A'-B': Detailaufnahmen Testes, Maßbalken: A-B: 100 µm, A'-B': 50 µm.

[Präparat: K. Ohler, BSc.]

4. 1. 5. 5. 3 *fgf-f* wird noch vor dem Schichtbarwerden einer Testes transkribiert

Bei männlichen Hydren war eine Transkription von *fgf-f* noch vor der Entstehung einer Testes sichtbar (Abb. 4.15 A, A'). In auswachsenden und vollständig entwickelten Testes war die Transkription ringförmig an der Basis in den ektodermalen Epithelzellen zu finden (Abb. 4.15 B, B').

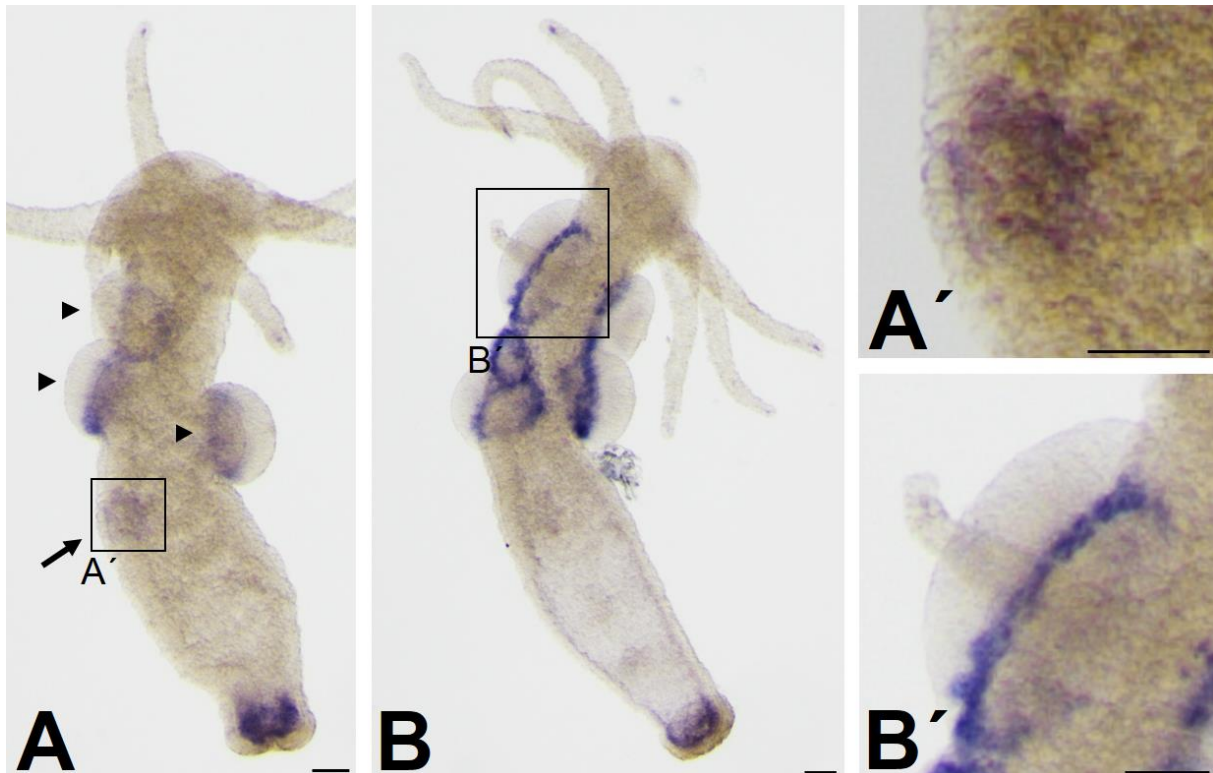


Abbildung 4.15: *fgf-f* Transkription in der Testes von *Hydra vulgaris* AEP.

(A) *fgf-f* Transkription zu Beginn der Testesentwicklung (schwarzer Pfeil) und in ausgewachsen Testes (schwarze Pfeilköpfe). (B) *fgf-f* Transkription kurz von Abschluss der Testesentwicklung. (A') *fgf-f* Transkription vor Auswachsen einer Testes. (B') *fgf-f* Transkription in ektodermalen Epithelzellen an der Basis einer Testes. A-B: Übersichtsaufnahmen, A'-B': Detailaufnahmen Testes. Maßbalken: 100 μm .

4. 1. 6 Nachweis von FGF-f in *Hydra*-Proteinextrakten, bei intakten Polypen und Einzelzell-Präparaten

fgf-f wird bei *Hydra* an allen Termini und morphologischen Grenzen transkribiert und wird phylogenetisch in die FGF Unterfamilie 8/17/18/24 eingruppiert (Lange et al., 2014). Daher war es interessant zu erfahren, wo sich das Protein befindet, damit so mögliche Rückschlüsse über seine Eigenschaften ziehen und spätere Versuche zur funktionellen Analyse entwickeln zu können. Zur Untersuchung der Verteilung des FGF-f Proteins wurden zwei polyklonale Antiseren in Kaninchen, gegen ein Epitop am C-Terminus von FGF-f (Abb. 4.16), hergestellt und gegen das Peptid affinitäts gereinigt (Firma Davids Biotechnologie).

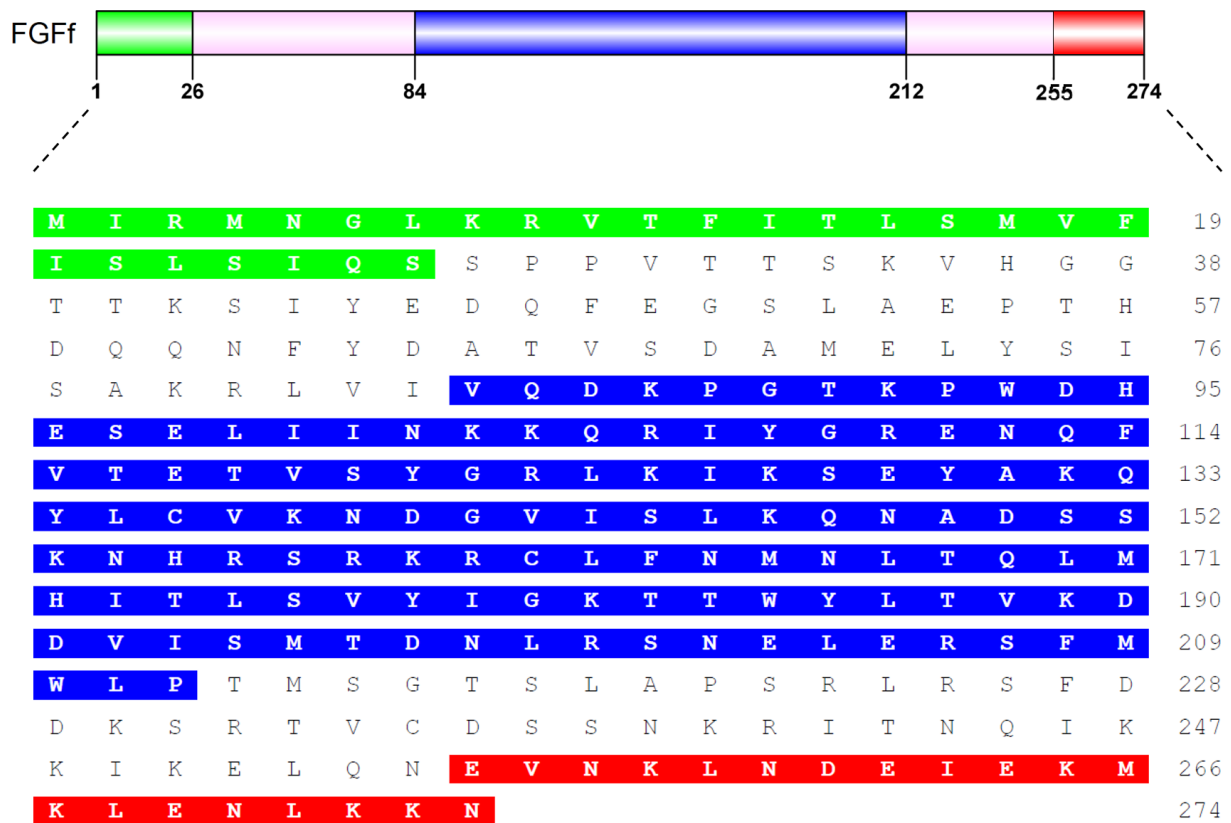


Abbildung 4.16: Proteinsequenz von FGF-f mit Antikörper-Epitop in rot.

grün/grün unterlegt: Signalpeptid, blau/blau unterlegt: Core-Region, rot/rot unterlegt: Antikörper-Epitop. Die Zahlen 1-274 sind die Aminosäuren, die Anfang/Ende einzelner Domänen darstellen.

4. 1. 6. 1 Western-Blot-Analyse mit einem Peptid-Antikörper gegen FGF-f

Um zu testen, ob die Antikörper gegen FGF-f ein Protein in der richtigen Größe detektieren, wurde zunächst ein Western Blot durchgeführt. Für FGF-f wurde eine Bande bei 31,5 kDa erwartet.

Für FGF-f wurden, bei beiden Antikörpern, bei einer Verdünnung von 1:100 eine Hauptbande bei 36 kDa, sowie mehrere deutlich schwächere Banden oberhalb und unterhalb der Hauptbande, detektiert (Abb. 4.17 Spur 2, 5). Bei einer Antikörperverdünnung von 1:500 und 1:1000 wurden nur die Hauptbande bei 36 kDa, sowie zwei weitere schwächere Banden bei 32 kDa und 14 kDa nachgewiesen (Abb. 4.17 Spur 3,4 und 6,7). Damit scheint zum einen, die bei 32 kDa detektierte Bande die Richtige zu sein, zum anderen kann aber auch die Bande bei 36 kDa stimmen. Denn durch posttranslationale Veränderungen, wie zum Beispiel Glykosylierung, kann sich das Molekulargewicht von Proteinen vergrößern. Für die Glykosylierung spricht auch, dass die Bande nach außen nicht scharf abgegrenzt ist (Guan et al., 2015).

Die Positivkontrolle Aktin wies eine Bande in der erwarteten Größe von 42 kDa auf (Abb. 4.17 Spur 1).

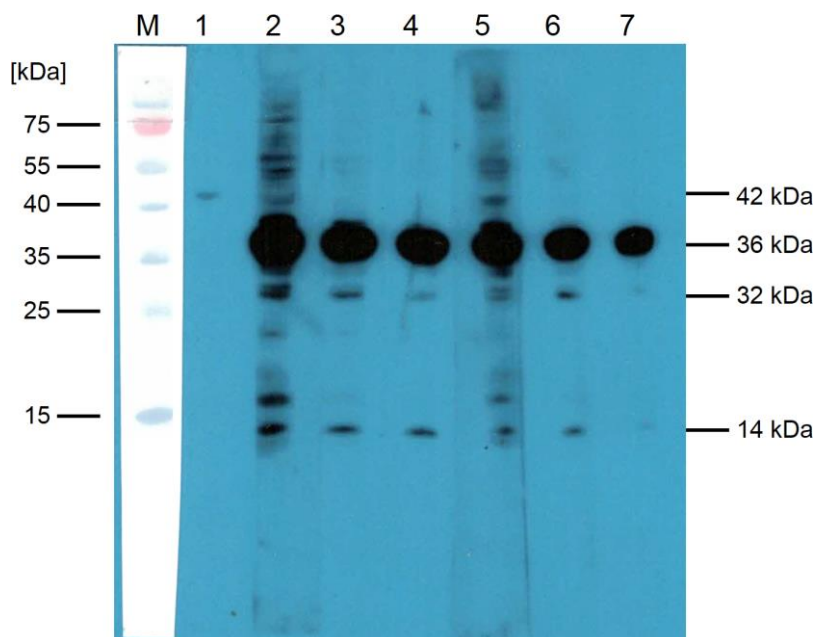


Abbildung 4.17: Western-Blot für die zwei polyklonalen Antikörper gegen FGF-f.

Spur M: Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Spur 1: anti-Aktin (Positivkontrolle), 1:20.000, 42 kDa. Spur 2: anti-FGF-f, 1:100 aus Kaninchen 1. Spur 3: anti-FGF-f, 1:500 aus Kaninchen 1. Spur 4: anti-FGF-f, 1:1000 aus Kaninchen 1. Spur 5: anti-FGF-f, 1:100 aus Kaninchen 2. Spur 6: anti-FGF-f, 1:500 aus Kaninchen 2. Spur 7: anti-FGF-f, 1:1000 aus Kaninchen 2. Für den Nachweis der Chemolumineszenz (ECL) auf Röntgenfilm wurden die zuvor abgeschnittenen und mit verschiedenen Antikörpern behandelten Membranstreifen in ihrer ursprünglichen Reihenfolge wieder zusammengelegt (Abschnitt 3. 2. 14). Belichtungszeit: 3 min.

4. 1. 6. 2 Western Blot Analyse und Immunhistochemie mit präabsorbierten Antikörper wies kaum unspezifische Antikörperbindung auf.

Um eine unspezifische Bindung des Erst-Antikörpers ausschließen zu können, wurden alle verwendeten Antikörper gegen ihre jeweiligen, zur Immunisierung verwendeten Peptide, geblockt. Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt.

Im Western Blot zeigte sich für FGF-f, dass die Bande, bei 36 kDa, nicht mehr detektiert wurde (Abb. 4.18, Spur 3, 4). Als Positivkontrolle wurde Aktin wie erwartet bei 42 kDa nachgewiesen (Abb. 4.18, Spur 7, 8). Trotz des Blockens der Antikörper gegen FGFRa und HVFGFRL1 waren die Banden noch vorhanden (Abb. 4. 18). Besonders deutlich wurde dies bei doppelter Belichtungszeit (1 min) (Anhang-Abb. 7.2).

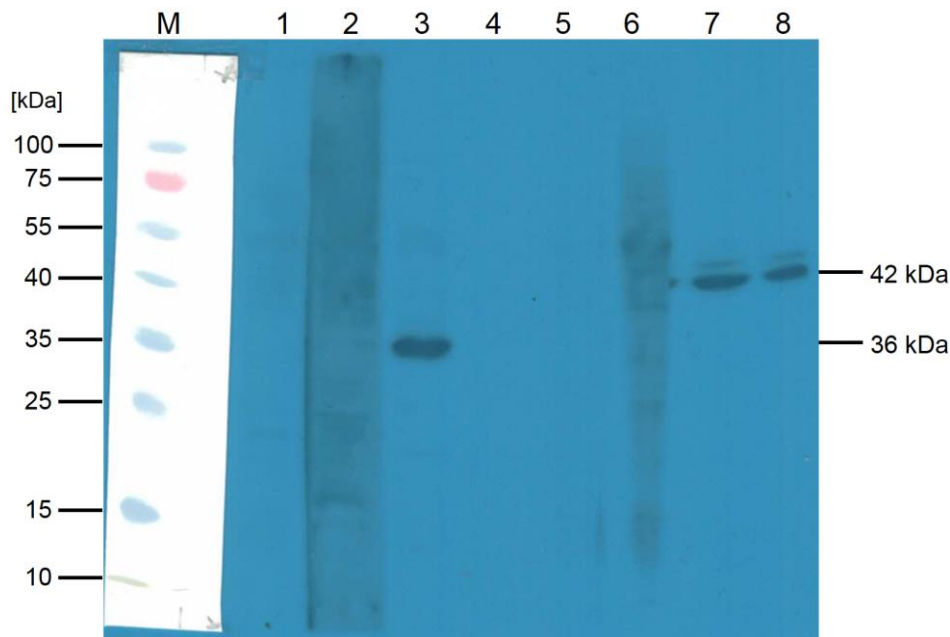


Abbildung 4.18: Western-Blot für präabsorbierten Antikörper gegen FGFRa, FGF-f und HvFGFRL1.

Spur M: Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Spur 1: anti-FGFRa, 1:500 aus Kaninchen 1. Spur 2: anti-FGFRa präabsorbiert, 1:500 aus Kaninchen 1. Spur 3: anti-FGF-f, 1:500 aus Kaninchen 1. Spur 4: anti-FGF-f präabsorbiert, 1:500 auch Kaninchen 1. Spur 5: anti-HvFGFRL1 1:500 aus Kaninchen 1. Spur 6: anti-HvFGFRL1 präabsorbiert, 1:500 aus Kaninchen 1. Spur 7, 8: anti-Aktin (Positivkontrolle), 1:20.000, 42 kDa, 36 kDa: Größe der erwarteten FGF-f Bande. Für den Nachweis der Chemolumineszenz (ECL) auf Röntgenfilm wurden die zuvor abgeschnittenen und mit verschiedenen Antikörpern behandelten Membranstreifen in ihrer ursprünglichen Reihenfolge wieder zusammengelegt (Abschnitt 3. 2. 14). Belichtungszeit: 30 Sekunden.

Nachdem der Antikörper gegen FGF-f spezifisch geblockt werden konnte, wurde zur Spezifizierung des AK-Signals als Negativkontrolle mit dem geblockten AK eine Immunhistochemie (IHC) durchgeführt. Als zweite Negativkontrolle wurde nur der 2. Antikörper verwendet. Beide IHCs, sowohl für den präabsorbierten Erst-Antikörper, als auch für die ausschließliche Verwendung des 2. Antikörpers, zeigten ein ähnliches Resultat. In beiden IHCs wurde eine leichte Hintergrundfärbung, die für *Hydra vulgaris* AEP typisch ist, detektiert (Abb. 4.19). Die IHC mit den zuvor geblockten Antikörper wies zu dem kleine, sehr helle, grüne Punkte auf (Abb. 4.19 A). Bei diesen Punkten handelt es sich möglicherweise um Antikörperkomplexe, denn sie waren verstärkt in den Proben zu beobachten, bei denen der Erst-Antikörper am Tag zuvor in Blocklösung verdünnt wurde.

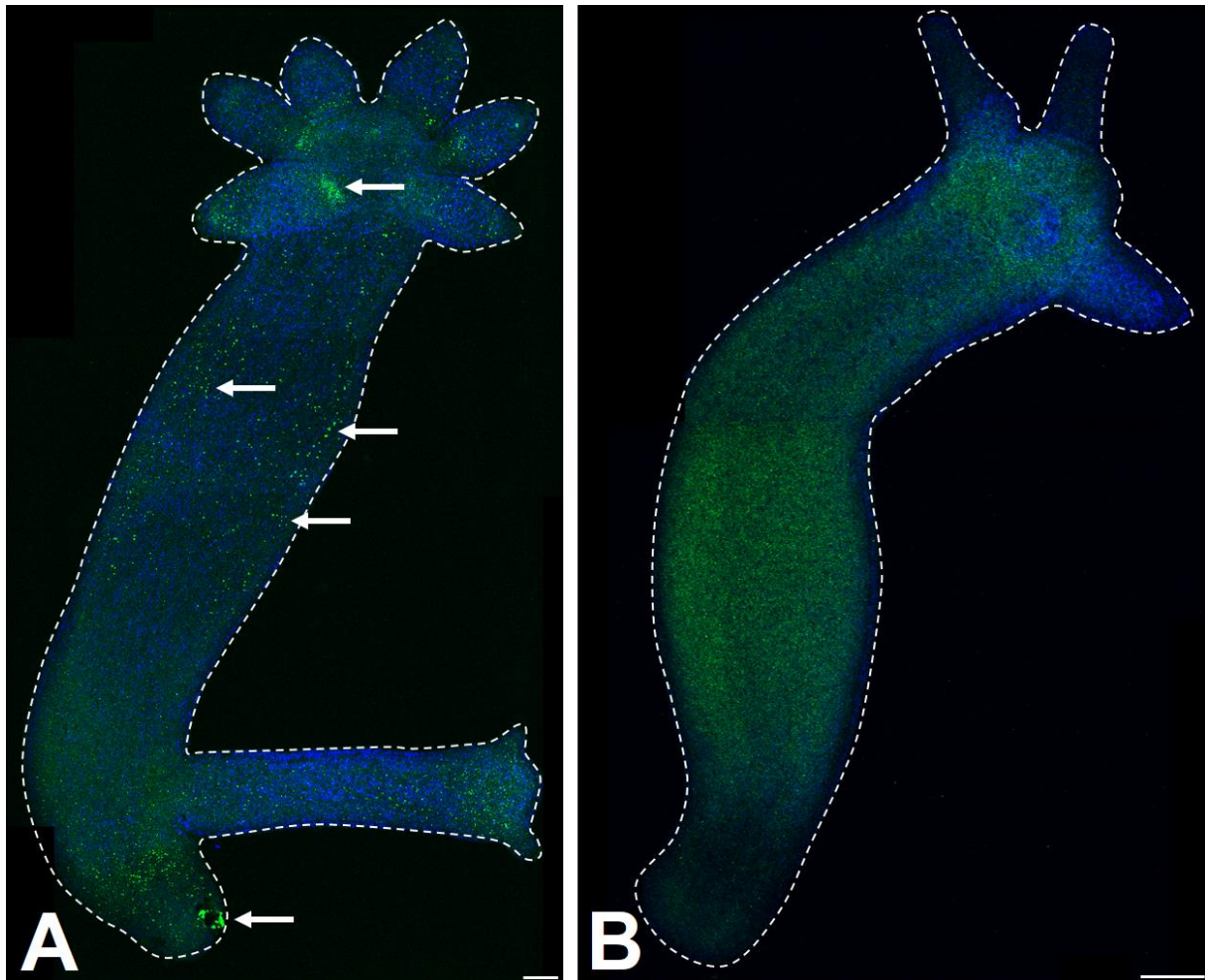


Abbildung 4.19: Immunhistochemie mit präabsorbierten Antikörper gegen FGF-f und mit ausschließlich verwendetem 2. Antikörper bei *Hydra vulgaris* AEP.

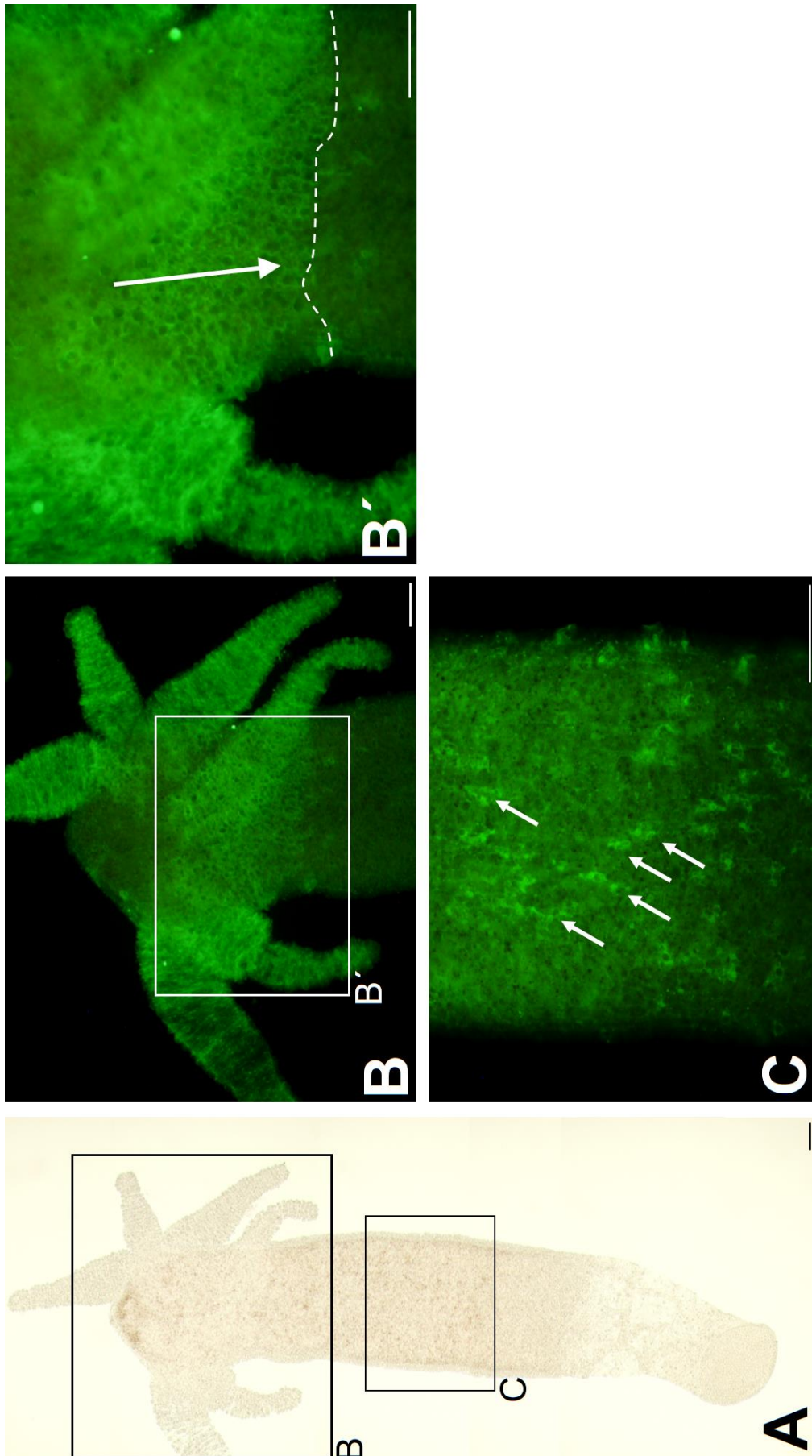
(A) IHC mit präabsorbierten Antikörper gegen FGF-f; kleine sehr helle grüne Punkte: eventuell Antikörperkomplexe (weiße Pfeile). (B) IHC ohne Erst-Antikörper, nur 2. Antikörper. gestrichelte Linien: Umrisse der Tiere, grün: Hintergrundfärbung bzw. Antikörperkomplexe, GFP markiert; blau: Zellkerne, DAPI Färbung; A-B: Fluoreszenz-Übersichtsaufnahmen, Maßbalken: 150 μm .

4. 1. 6. 3 Immunhistochemie für FGF-f weist Protein an verschiedenen Stellen im Tier nach

Für die Untersuchung der Lokalisation des Proteins von FGF-f im intakten Polypen und zum Vergleich mit dem *fgf-f* Transkriptionsmuster, wurden ganze Polypen mit und ohne Knospen immunhistochemisch untersucht.

Die Immunhistochemie ergab, dass das Protein von Tier zu Tier z.T. sehr variabel verteilt war. Bei allen Tieren war zu sehen, dass FGF-f nicht nur in einzelnen Zellen, sondern auch im interstitiellen Raum lokalisiert war (Abb. 4.20 B, B'). Zudem wiesen alle Tiere kleine Bereiche, in denen das Protein extrazellulär lokalisiert war, auf. Diese Bereiche waren über die gesamte Körpersäule verteilt (Abb. 4.20 C). Innerhalb dieser Bereiche waren

Nematoblasten zu erkennen (Abb. 4.20 C). Die Unterschiede in der Lokalisation des Proteins zeigten sich im Kopfbereich der Tiere. Einige Tiere zeigten einen graduellen Verlauf des Proteins vom Tentakelkranz in Richtung Körpersäule (Abb. 4.20 B, B'). Es war zu erkennen, dass das Protein sich im interstitiellen Raum befand, somit also sekretiert wurde. Die Menge an sekretiertem Protein nahm dabei in aboraler Richtung ab (Abb. 4.20 B'). Bei anderen Tieren war kein Gradient unterhalb der Tentakel zu erkennen. Im Bereich des Hypostoms fanden sich nur wenige kleine Bereiche, etwa im Gebiet der Mundöffnung, die FGF-f positiv waren (Abb. 4.24 A, weißer Pfeilkopf). In der Tentakelzone und in den Tentakeln war die Lokalisation von FGF-f ebenfalls sehr variabel. Es traten Unterschiede sowohl zwischen den Tieren, als auch zwischen Tentakeln eines Tieres auf. Bei einigen Tentakeln war zu erkennen, dass die Batteriezellen in der Spitze das Protein aufwiesen (Abb. 4.21 A, A'). Weiterhin konnte das Protein auch bei einzelnen Batteriezellen im Tentakel detektiert werden (Abb. 4.21 A''). Distal von der Tentakelbasis konnten ebenfalls einige Bereiche, in denen FGF-f sekretiert war, nachgewiesen werden (Abb. 4.21 B, B'). In Stiel waren Ganglienzellen FGF-f positiv (Abb. 4.22 A'). Hierbei wiesen sowohl der Zellkörper, als auch die Axone und Dendriten FGF-f auf (Abb. 4.22 A'). Ähnlich variabel, wie bei den Tentakeln war auch die Verteilung des Proteins in der Basalscheibe (Abb. 4.22 B, B'). Entweder waren einige ektodermalen Epithelzellen am oberen Ende der Basalscheibe, am unteren Ende (Abb. 4.22 B') oder innerhalb der Basalscheibe FGF-f positiv.



▲ **Abbildung 4.20: FGF-f Lokalisation in der oberen Körpersäule von *Hydra vulgaris* AEP.**

(A) Adulte knospenlose *Hydra*. (B) Lokalisation von FGF-f im Bereich des Kopfes. (B') extrazellulärer FGF-f Gradient in der Tentakelzone, langer weißer Pfeil: Gradientenverlauf von hoher zu niedriger Konzentration, gestrichelte Linie: Ende des Gradienten. (C) extrazelluläre FGF-f positive Bereiche in der Körpersäule, kleine weiße Pfeile: extrazelluläre FGF-f positive Bereiche in der Körpersäule. Grün: FGF-f, GFP markiert. A: Durchlicht-Übersichtsaufnahme, B, C: Fluoreszenz-Übersichtsaufnahmen Tentakelzone und Körpersäule, B': Fluoreszenz-Detailaufnahme Tentakelzone, Maßbalken: 100 µm.

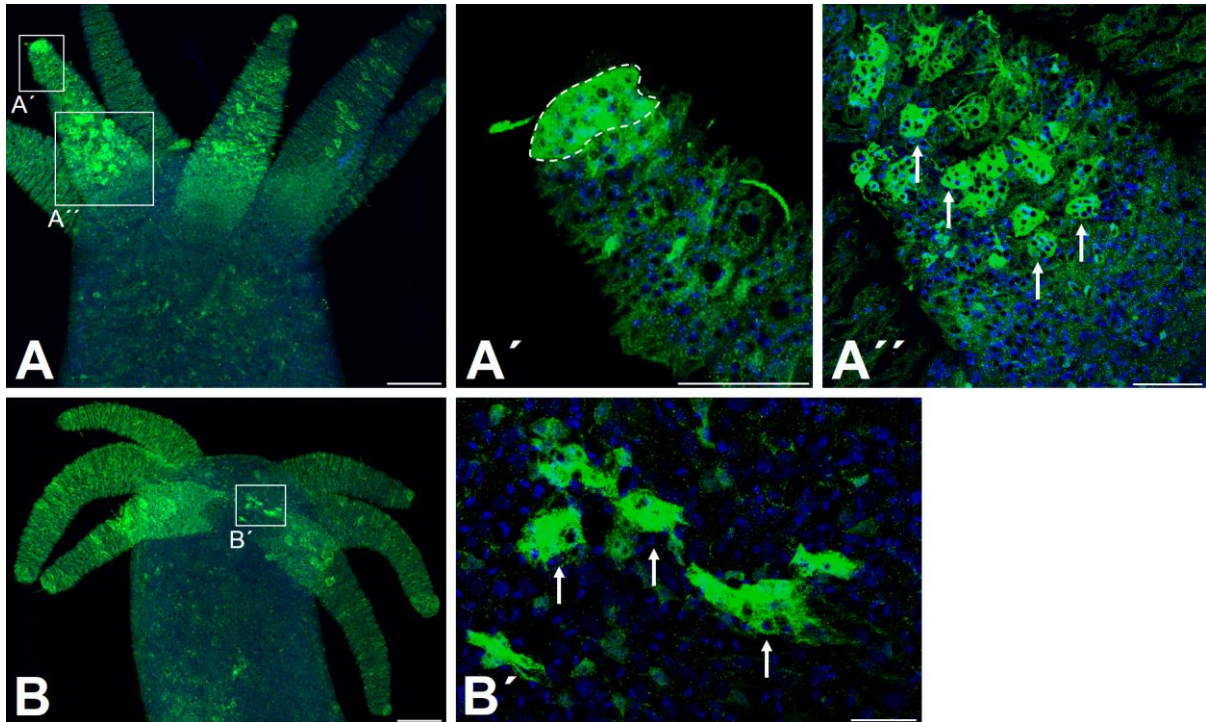


Abbildung 4.21: FGF-f Lokalisation innerhalb der Tentakelzone und in den Tentakeln von *Hydra vulgaris* AEP.

(A, B) Variable FGF-f Verteilung im Kopfbereich von *Hydra*. (A') FGF-f in den äußersten Batteriezellen der Tentakelspitze lokalisiert (gestrichelte Linie). (A'') FGF-f ist zum Teil in einzelnen Batteriezellen entlang des Tentakels vorhanden. (B'): FGF-f wird nah der Tentakelbasis, auf unterschiedlich großen Flächen sekretiert (weiße Pfeile). Grün: FGF-f, GFP markiert; blau: Zellkerne, DAPI Färbung. A,B: Fluoreszenz-Übersichtsaufnahmen obere Körperhälfte von *Hydra*, A': Fluoreszenz-Detailaufnahme Tentakelspitze, A'': Fluoreszenz-Detailaufnahme unteres Drittel eines Tentakels, B': Fluoreszenz-Detailaufnahme unterhalb der Tentakelbasis, Maßstab: A, B: 150 µm, A': 25 µm, A'', B': 50 µm.

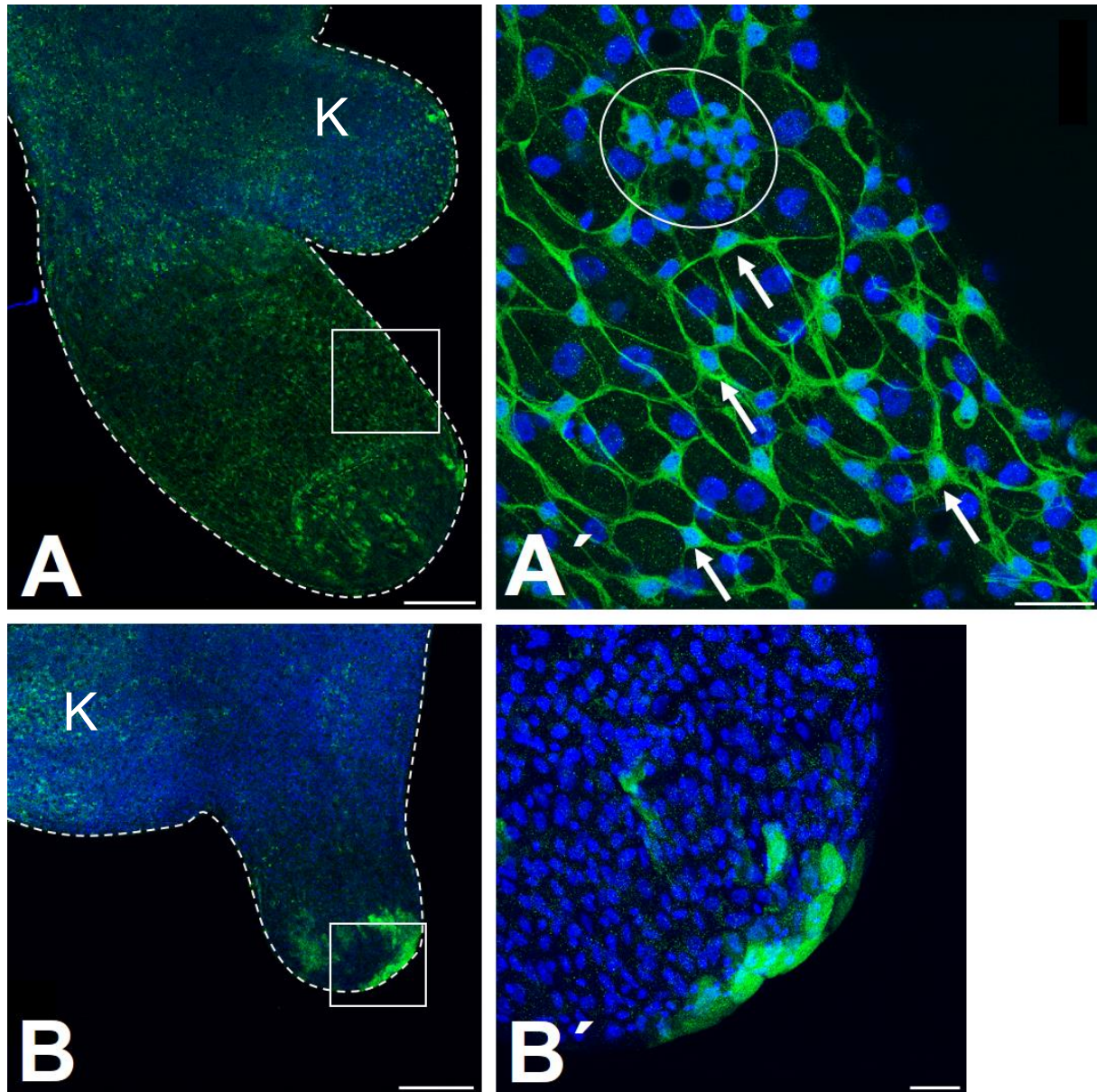


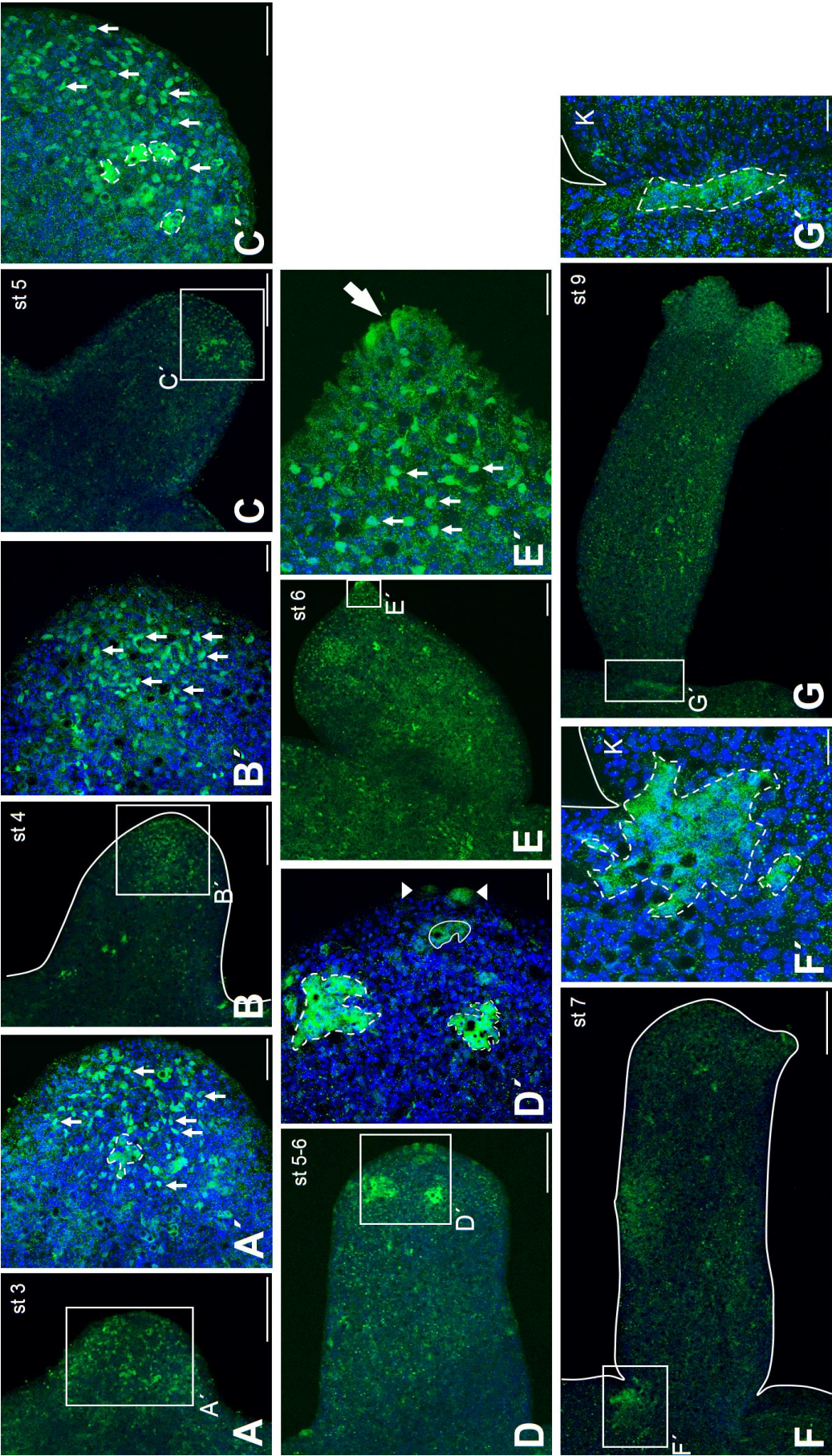
Abbildung 4.22: FGF-f Lokalisation in der unteren Körperhälfte von *Hydra vulgaris* AEP.

(A,B) Variabel Verteilung von FGF-f in der Knospungszone, im Stiel und der Basalscheibe; K:Knsope. (A') FGF-f in Ganglienzellen des Stiels lokalisiert, weiße Pfeile: einzelne Zellkörper von Ganglienzellen, weißer Kreis: FGF-f positives Nematoblastennest. (B') FGF-f in unteren ektodermalen Basalscheibenzellen lokalisiert. Grün: FGF-f, GFP markiert; blau: Zellkerne, DAPI Färbung, gestrichelte Linen: Tierumriss A-B: Fluoreszenz-Übersichtsaufnahmen, A'-B': Fluoreszenz-Detailaufnahmen Stiel und Basalscheibe, Maßbalken: A-B: 150 µm, A'-G': 25 µm.

[kleine, sehr helle, grüne Punkte: Antikörperkomplexe]

Während der Knospung konnte FGF-f bei einer Knospe in Stadium 3, auf etwa 2/3 der Knospe, von distal nach proximal detektiert werden (Abb. 4.23 A, A'). Dabei befand sich das Protein zum Teil innerhalb einzelner Zellen, aber auch in einzelnen Flecken zwischen den Zellen (Abb. 4.23 A'). Zu Beginn der Elongationsphase (Stadium 4) war FGF-f hauptsächlich auf die Spitze der Knospe konzentriert (Abb. 4.23 B, B'). Auch hier waren einzelne FGF-f

positive Zellen sichtbar. In Stadium 5 wiesen die einzelnen Zellen der Knospe noch immer FGF-f auf. Zusätzlich waren nun auf einer Seite der Knospenspitze kleine beieinanderliegende Bereiche sichtbar, in denen FGF-f sekretiert war (Abb. 4.23 C, C'). Bei Übergang von Stadium 5 zu 6 waren die kleinen einzelnen FGF-f positiven Bereiche verschwunden und es waren größere Flächen im Bereich der späteren Tentakel zu sehen. Des Weiteren waren auch im Hypostom Zellen und kleine Flächen FGF-f positiv (Abb. 4.23 D, D'). In Stadium 6, wenn sich die ersten Tentakelknospen gebildet hatten, waren ektodermalen Epithelzellen der Spitze dieser Tentakelknospen FGF-f positiv (Abb. 4.23 E, E'). An der Basis der Tentakelknospe konnten zudem einzelne Zellen, die das Protein aufwiesen, detektiert werden (Abb. 4.23 E, E'). Mit Erreichen von Stadium 7 kam zusätzlich zu den bisherigen Stellen, an denen das Protein lokalisiert war, noch eine Fläche an der Basis der Knospe dazu (Abb. 4.23 F, F'). Es war zu erkennen, dass FGF-f sich zwischen den Zellen, sowohl auf der Seite des Elterntiers, als auch auf der Seite der Knospe, befand (Abb. 4.23 F'). In Stadium 9 hatte sich dieser Bereich entlang der Knospenbasis auf das Gebiet ausgebreitet, in dem Knospe und Elterntier noch miteinander verbunden waren (Abb. 4.23 G, G'). Zudem wurde es nur noch auf der Seite des Elterntieres sekretiert (Abb. 4.23 G, G').



▲ Abbildung 4.23: FGF-f Proteinlokalisierung während der Knospung von *Hydra vulgaris* AEP.

(A-G) Lokalisation von FGF-f von Knospenstadium 3-9; weiße Linie: Umriss Elterntier-Knospe. (B') FGF-f in einzelnen Zellen lokalisiert (weiße Pfeile). (C') FGF-f in einzelnen Zelle lokalisiert (weiße Pfeile) und in kleinen Bereichen sekretiert (gestrichelte Linien). (D') FGF-f in Bereichen der späteren Tentakelknospen großflächig sekretiert (gestrichelte Linien), zusätzliche Sekretion im Bereich des Hypostoms (weiße Linie) und in der Mundöffnung (Pfeilköpfe). (E') FGF-f ist in den Zellen der Tentakelspitze (großer weißer Pfeil) und in Zellen an der Tentakelbasis (kleine weiße Pfeile) lokalisiert. (F') FGF-f an Knospenbasis großflächig sekretiert (gestrichelte Linie), K: Knospe, weiße Linie: Umriss Elterntier-Knospe. (G') FGF-f wird in einem schmalen Streifen an der Knospenbasis sekretiert (gestrichelte Linie), K: Knospe, weiße Linie: Umriss Elterntier-Knospe. Grün: FGF-f, GFP markiert; blau: Zellkerne, DAPI Färbung. A-G: Fluoreszenz-Übersichtsaufnahmen Knospe, A'-D': Fluoreszenz-Detailaufnahmen Knospenspitze, E': Fluoreszenz-Detailaufnahme Tentakelknospe, F'-G': Fluoreszenz-Detailaufnahmen Knospenbasis. Maßbalken: A-G: 150 µm, A', C': 50 µm, B', D'-G': 25 µm.

Aufgrund starker Hintergrundfluoreszenz und einer hohen Menge an Antikörperkomplexen wurde bei den Vergrößerungen z.T. Fokusebene verändert, um eine optimale Darstellung des Fluoreszenzsignals zu erhalten.

[kleine, sehr helle, grüne Punkte: Antikörperkomplexe]

Bei männlichen Tieren war, neben der bereits beschriebenen Lokalisation des Proteins, auch in den ektodermalen Epithelzellen der Testes FGF-f lokalisiert. Bei einer noch nicht vollständig entwickelten Testes waren die distalen ektodermalen Epithelzellen stark FGF-f positiv (Abb. 4.24 A, C). Die proximalen ektodermalen Epithelzellen wiesen in Gegensatz dazu etwas weniger FGF-f auf (Abb. 4.24 A, C). Bei einer ausgewachsenen Testes waren die apikal-distalen ektodermalen Epithelzellen stark FGF-f positiv (Abb. 4.24 A, B). Die Zellen an der Basis der Testes wiesen kaum noch FGF-f auf (Abb. 4.24 B).

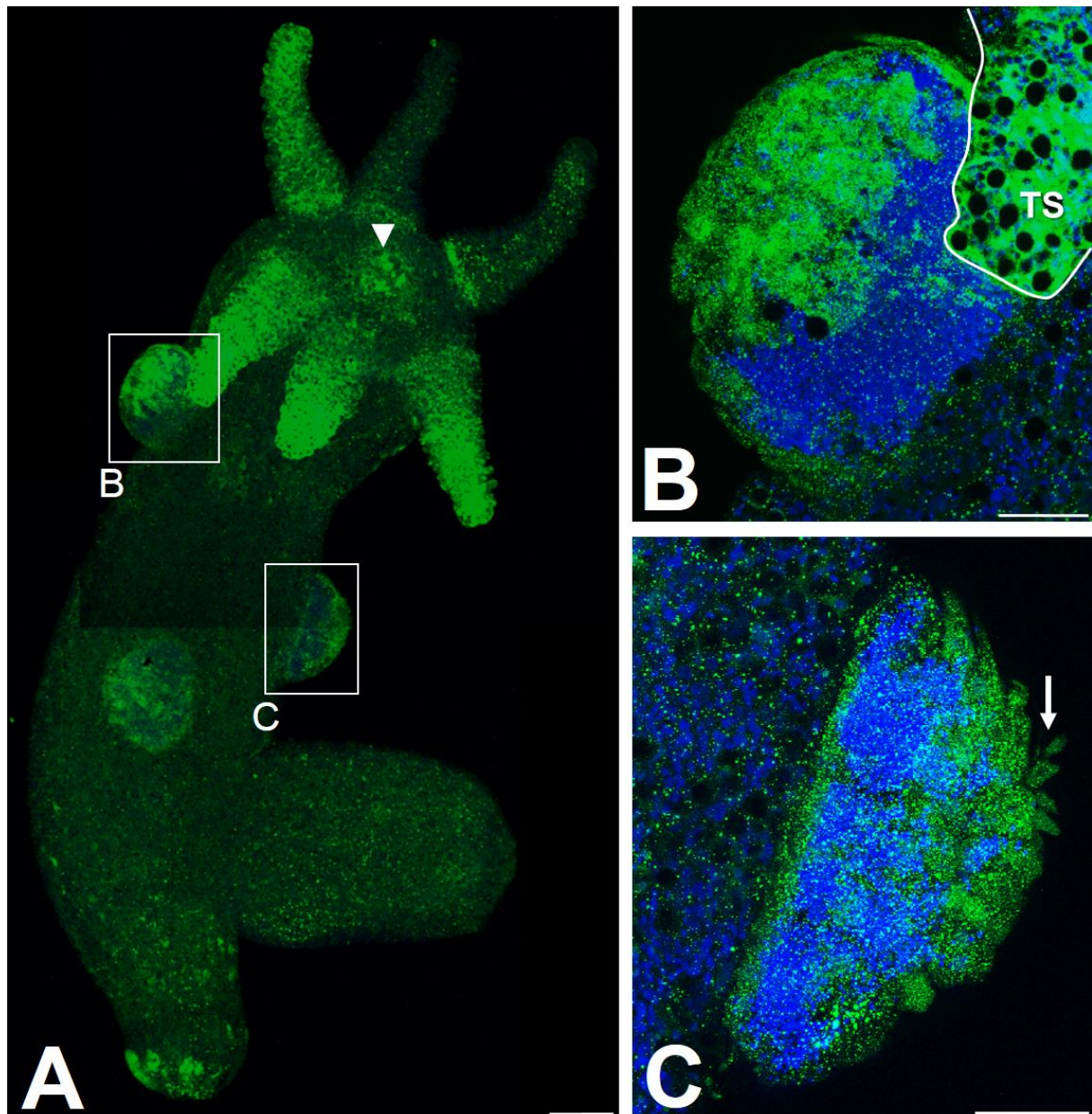


Abbildung 4.24: FGF-f Proteinlokalisierung in der Testes von *Hydra vulgaris* AEP.

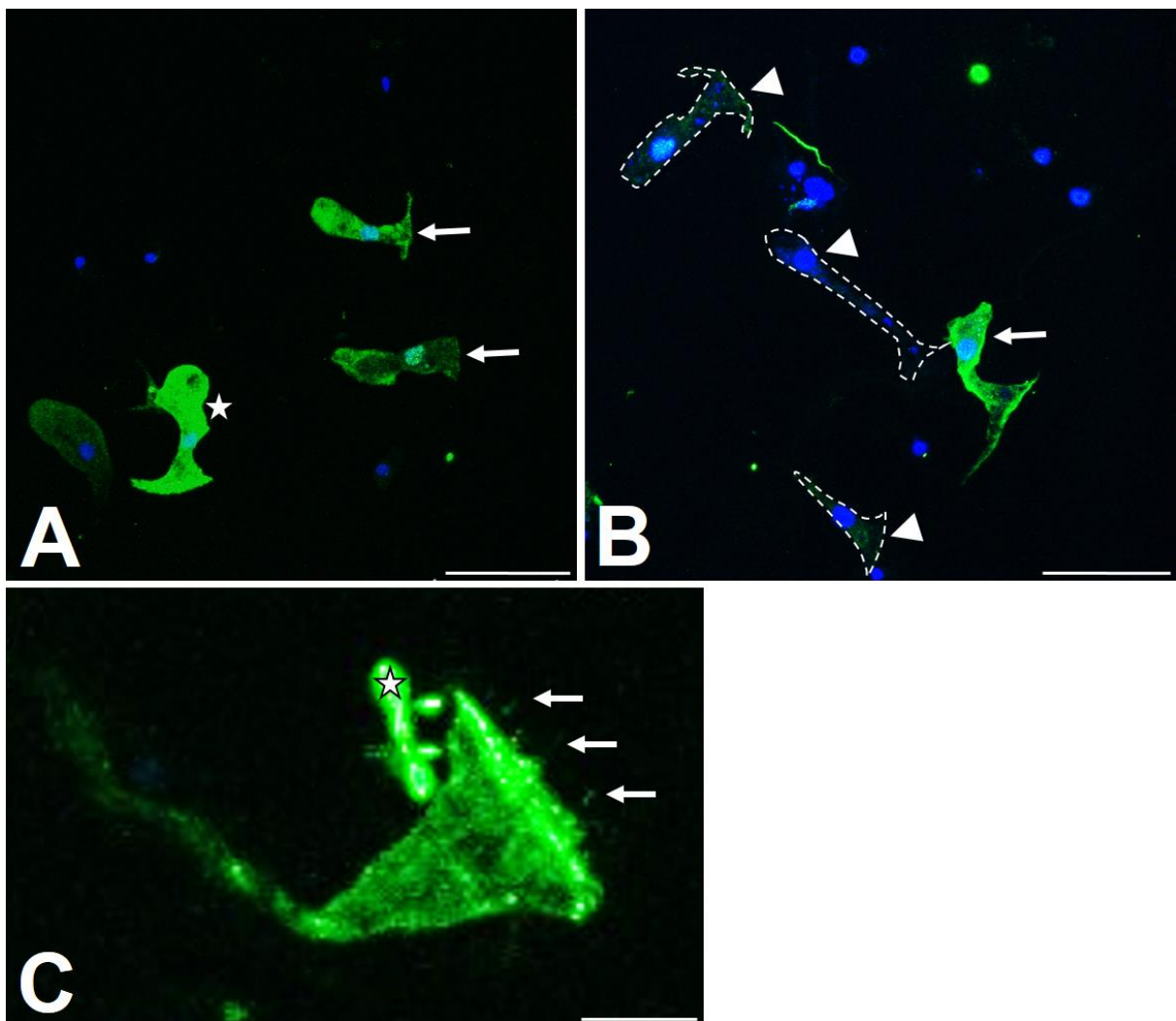
(A) Verteilung von FGF-f in einer männlichen *Hydra*. (B-C) Hauptsächlich apikale Lokalisation von FGF-f in der Testes. TS: Tentakelspitze, weiße Linie: Umriss Tentakelspitze, weißer Pfeilkopf: FGF-f Lokalisation in Bereich der Mundöffnung, weißer Pfeil: einzelne FGF-f positive Zellen. Grün: FGF-f, GFP markiert; blau: Zellkerne, DAPI Färbung. A: Fluoreszenz-Übersichtsaufnahme, B-C: Fluoreszenz-Detailaufnahme Testes, Maßbalken: A: 150 μ m, B-C: 50 μ m.

[kleine, sehr helle, grüne Punkte: Antikörperkomplexe]

4. 1. 6. 4 Immunhistochemie an Einzelzellen weist FGF-f in Vesikeln im Zytoplasma ekto- und entodermaler Epithelzellen nach

Um die zelluläre Lokalisation von FGF-f zu untersuchen, wurden ganze Hydren mittels Essigsäure und Glycerin in Einzelzellen zerlegt, wobei die natürliche Form der Zellen erhalten bleibt, und so direkt erkennbar ist, wo in der Zelle sich das Protein befindet.

Die Auswertung der Präparate zeigte, dass FGF-f in einem Teil der entodermalen und ektodermalen Epithelzellen vorhanden war (Abb. 4.25 B; 4.26). Dabei war das Protein bei manchen Zellen im gesamten Zytoplasma verteilt (Abb. 4.25 A, B; 4.26 A, B). Bei anderen Zellen befand es sich hauptsächlich an der basalen, der Mesogloea zugewandten, Seite der Zelle (Abb. 4.25 C). Auch besaßen die Zellen eine unterschiedliche Menge an FGF-f (Abb. 4.25 A; 4.26 C). Des Weiteren war zu erkennen, dass das Protein zum Teil wahrscheinlich in Vesikeln eingeschlossen war (Abb. 4.26 B, C).



▲ **Abbildung 4.25: Mazerat-Immunhistochemie 1 für FGF-f bei *Hydra vulgaris* AEP.**

(A) entodermalen Epithelzellen, mit unterschiedlich viel FGF-f Protein, Stern: stark FGF-f positive entodermale Epithelzellen, weiße Pfeile: schwach FGF-f positive entodermale Epithelzellen. (B) FGF-f positive entodermale Epithelzelle in Vergleich mit FGF-f negativen ento- und ektodermalen Epithelzellen, weißer Pfeil: FGF-f positive entodermale Epithelzelle, weiße Pfeilspitzen: FGF-f negative entodermale und ektodermale Epithelzellen, weiße gestrichelte Linien: Zellenumriss. (C) hauptsächlich basale Lokalisation von FGF-f in einer entodermalen Epithelzelle, weiße Pfeile: Filopodien, Stern: Artefakt. grün: FGF-f, GFP markiert, blau: Zellkerne, DAPI Färbung. A-C: Fluoreszenz-Detailaufnahme einzelner Zellen, Maßbalken: A-B: 50 μm , C: 10 μm .

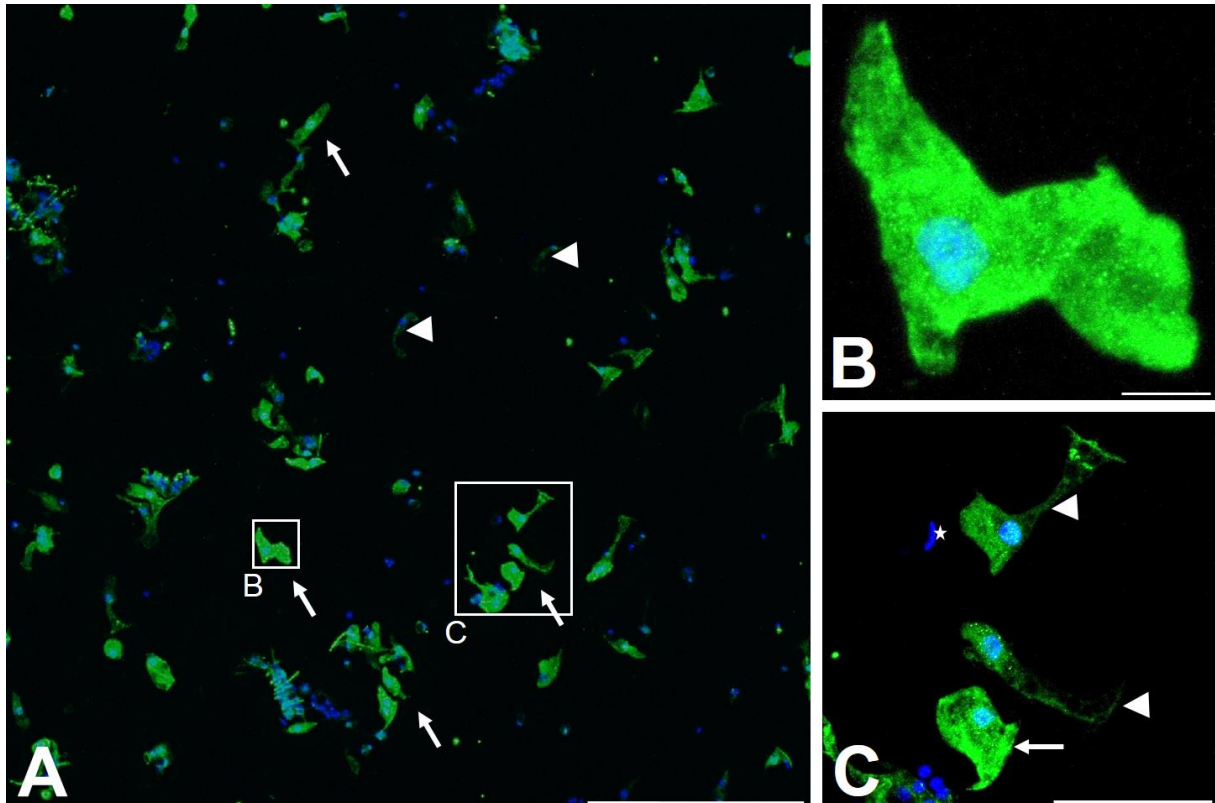


Abbildung 4.26: Mazerat-Immunhistochemie 2 für FGF-f bei *Hydra vulgaris* AEP.

(A) Lokalisation von FGF-f im Einzelzellpräparat, weiße Pfeile: FGF-f positive Zellen, weiße Pfeilspitzen: FGF-f negative entodermale Epithelzellen. (B) stark FGF-f positive ektodermale Epithelzelle. (C) ento- und ektodermale Epithelzellen mit unterschiedlich viel FGF-f Protein, weißer Pfeil: stark FGF-f positive ektodermale Epithelzelle; weiße Pfeilspitzen: schwach FGF-f positive entodermale Epithelzellen, Stern: Zellkern einer Nesselkapsel. grün: FGF-f, GFP markiert, blau: Zellkerne, DAPI Färbung. A: Fluoreszenz-Übersichtsaufnahme, B-C: Fluoreszenz-Detailaufnahme einzelner Zellen, Maßbalken: A: 250 μm , B: 10 μm und C: 50 μm .

4. 2 Identifikation weiterer FGF-Rezeptoren bei *Hydra vulgaris*

Seit 2004 ist bekannt, dass *Hydra* mindestens einen FGF-Rezeptor (FGFRa, Kringelchen) besitzt (Sudhop et al., 2004). Dieser wird während der Knospung transkribiert und ist für die Knospenablösung wichtig (Sudhop et al., 2005; Hasse et al., 2014). Da nichts über die Lokalisation des Proteins bekannt war, wurden von mir dahingehend Untersuchungen durchgeführt.

Dr. N. Rebscher (AG Hassel) gelang es genomische und EST Fragmente zu isolieren, die für zwei weitere FGF-Rezeptoren codieren. Zum einen handelt es sich um einen zweiten kanonischen FGFR (FGFRb) (Rudolf et al., 2013), zum anderen um einen möglichen FGFRLike1 (HvFGFRL1) Kandidat (nicht publizierte Daten, Dr. N. Rebscher). Beide möglichen Rezeptoren wurden im Weiteren von mir und zwei von mir betreuten Studenten untersucht. Die Isolation und Klonierung erfolgte zusammen mit MSc-Student J. Heller. Die ersten von mir durchgeführten *in situ* Hybridisierungen wurden von BSc-Studentin K. Adamkiewicz wiederholt und verifiziert.

4. 2. 1 FGFR Proteinlokalisierung an verschiedenen Stellen im Polypen

Um Aussagen über die Proteinlokalisierung von FGFRa treffen zu können, wurde ein spezifischer Peptid-AK hergestellt, der ein Epitop innerhalb der dritten Ig-ähnlichen Schleife erkennt (Abb. 4.27). Zum Zeitpunkt der Herstellung des AK bzw. zum Zeitpunkt der Epitopsuche, war mir nichts über einen zweiten FGFR (FGFRb) oder die hohe Sequenzähnlichkeit (Abschnitt 4. 2. 2. 1) bekannt. Nach Ermittlung der AS-Sequenz von FGFRb zeigte sich, dass FGFRb ein identisches Epitop besitzt und somit beide Rezeptoren (FGFRa und FGFRb) über den AK detektiert werden. Daher wird in diesem Abschnitt und später in der Diskussion nur von FGFR, ohne weitere Spezifikation, die Rede sein.

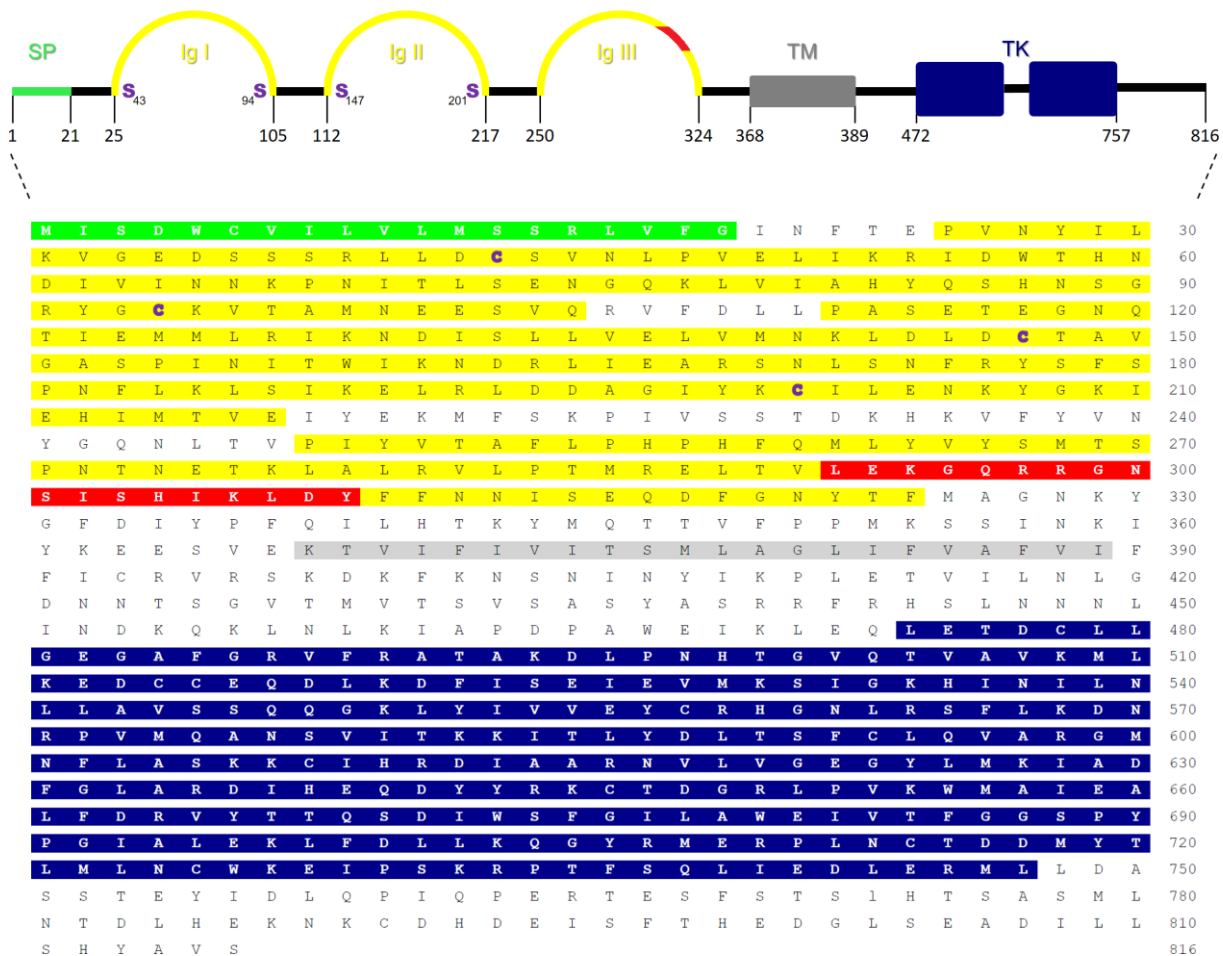


Abbildung 4.27: Proteinsequenz von FGFRa mit Antikörper-Epitop in rot.

Grün/grün unterlegt: Signalpeptid, gelb/gelb unterlegt: Ig I-III, violett: Cysteine für die Bildung Ig-ähnlicher Schleifen, rot/rot unterlegt: Antikörper-Epitop, grau/grau unterlegt: Transmembran-Domäne, blau/blau unterlegt: Tyrosinkinase-Domäne. Die Zahlen 1-816 sind die Aminosäuren, die Anfang/Ende einzelner Domänen darstellen.

Die Verteilung des FGFR Proteins war ähnlich komplex und z.T. überlappend mit der von FGF-f. Im adulten Tier wurde der FGFR in einigen Batteriezellen der Tentakel synthetisiert. Es waren z.T. die Zellen, ähnlich wie bei FGF-f, direkt an und/oder nahe der Tentakelspitze FGFR positiv (Abb. 4.29 A, B). Zur Lokalisation an der Tentakelbasis lässt sich keine Aussage treffen, da sich die Tentakel während der Fixierung für die IHC stark zusammen gezogen hatten, sodass eine eindeutige Aussage nicht möglich ist. Entlang der Körpersäule fanden sich ähnlich wie bei FGF-f kleine FGFR positive Bereiche. Hierbei schien es sich um ektodermale Epithelzellen zu handeln (Abb. 4.29 A). Des Weiteren trugen, wie bei FGF-f, ektodermale Epithelzellen der Basalscheibe den Rezeptor. Es waren zum Teil einzelne Zellen, aber auch kleine Zellgruppen (Abb. 4.29 D). Ebenfalls identisch mit FGF-f war die Lokalisation von FGFR in den Ganglienzellen im Stiel (Abb. 4.28 C). Zur Knospung lässt nur etwas zur Lokalisation in Stadium 6 und 10 sagen. Für die anderen Stadien verlief aus

unerklärlichen Gründen keine IHC positiv. In Stadium 6 zeigte sich, dass kein Protein von FGFR an der Knospensbasis vorhanden war (Abb. 4.28 A). In der gesamten Spitze der Knospe waren einzelne Zellen vorhanden, die den Rezeptor aufwiesen. Im Bereich einer späteren Tentakelknospe waren stark FGFR positive Zellen vorhanden (Abb. 4. 28 A, B). Bei einer Knospe in Stadium 10 waren an der Basis der Knospe auf der Seite des Elterntiers einige Zellen die sehr viel FGFR aufwiesen, vorhanden (Abb. 4.29 C). Ferner zeigte die Knospe die gleiche Proteinverteilung, wie das Elterntier (Abb. 4.29 A).

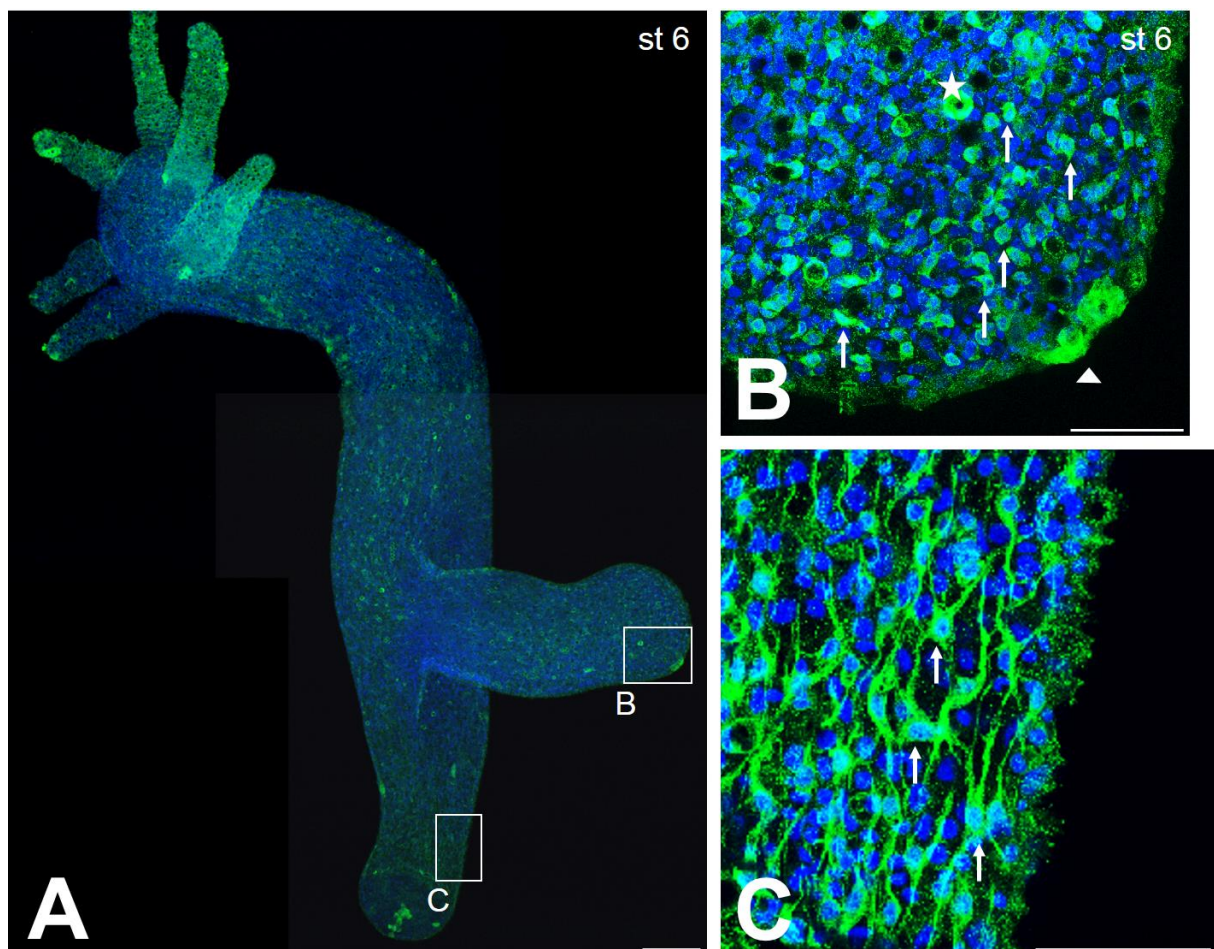


Abbildung 4.28: Lokalisation von FGFR bei *Hydra vulgaris* AEP mit Knospe Stadium 6.

(A) Proteinverteilung von FGFR bei einem adulten Tier mit einer Knospe in Stadium 6. (B) FGFR Lokalisation in der Knospenspitze einer Stadium 6 Knospe, weiße Pfeile: einzelnen Zellen, die FGFR positiv sind, weißer Pfeilkopf: Zellen im Bereich der späteren Tentakelknospe, die FGFR positiv sind, Stern: Reflektion, durch Stenotele erzeugt. (C) Ganglionäre Zellen des Nervensystem sind FGFR positiv, weiße Pfeile: markieren Zellkörper einiger einzelner FGFR positiver Ganglienzellen. Grün: FGFR, GFP markiert, blau: Zellkerne, DAPI Färbung A: Fluoreszenz-Übersichtsaufnahme, B: Fluoreszenz-Detailaufnahme Knospenspitze, C: Fluoreszenz-Detailaufnahme Ganglienzellen im Stiel. Maßbalken: A:150 μm , B-C: 50 μm .

[kleine, sehr helle, grüne Punkte: Antikörperkomplexe]

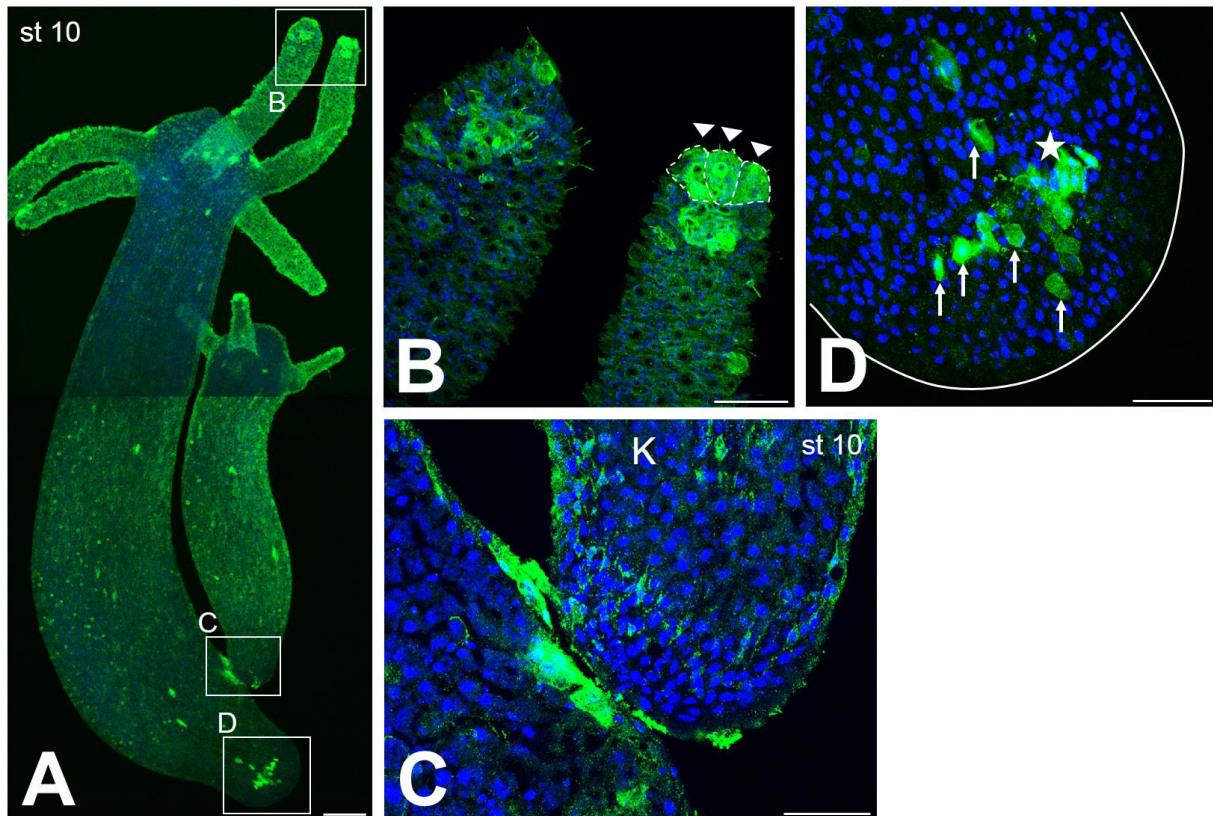


Abbildung 4.29: Lokalisation von FGFR bei *Hydra vulgaris* AEP mit Knospe Stadium 10.

(A) Proteinverteilung von FGFR bei einem Tier mit einer Knospe in Stadium 10, st: Stadium (B) FGFR Lokalisation in der Tentakelspitze, weiße Pfeilköpfe: 3 FGFR positive Batteriezellen in der Tentakelspitze, gestrichelte Linien: markieren Zellgrenzen. (C) FGFR Lokalisation in ektodermalen Epithelzellen an der Knospenbasis, K: Knospe, st: Stadium. (D) FGFR Lokalisation in ektodermalen Epithelzellen der Basalscheibe, weiße Pfeile: einzelne FGFR positive Zellen, Stern: kleine Gruppe von FGFR positiven Zellen, weiße Linie: Umriss Basalscheibe. Grün: FGFR, GFP markiert, blau: Zellkerne, DAPI Färbung A: Fluoreszenz-Übersichtsaufnahme, B: Fluoreszenz-Detailaufnahme Tentakelspitze, C: Fluoreszenz-Detailaufnahme Knospenbasis, D: Fluoreszenz-Detailaufnahme Basalscheibe Elterntier. Maßbalken: A: 150 µm, B-C: 50 µm.

[kleine, sehr helle, grüne Punkte: Antikörperkomplexe]

4. 2. 2. 1 Putative Struktur und Eigenschaften der aus den FGFRb ORFs abgeleiteten Proteinsequenz

Aus den Vorarbeiten von Dr. Rebscher war bekannt, dass es für die Sequenz von FGFRb zwei Fragmente FGFRb_ex und FGFRb_in gab (Abb. 4.30). FGFRb_ex codiert für die ersten beiden Ig-ähnlichen Schleifen, wobei die Sequenz aufgrund eines Stop-Codons abbricht. FGFRb_in codiert für den C-terminalen Teil der Tyrosinkinase-Domäne und enthält möglicherweise einen Rasterschub. Die Sequenz für die Ig III, die Transmembran-Domäne, und auch für den N-terminalen Bereich der Tyrosinkinase-Domäne, war nicht vorhanden (Abb. 4.30).



Abbildung 4.30: Strukturübersicht der Sequenzfragmente von FGFRb aus der Compagen Datenbank.

grün: Signalpeptid (SP), gelb: Ig-ähnlichen Schleifen (Ig I-II), violetten S: Disulfidbrücken, grau: fehlende Strukturen: IgIII Transmembran-Domäne (TM) und N-terminaler Bereich der Tyrosinkinase-Domäne (TK), dunkelblau: C-terminaler Bereich Tyrosinkinase-Domäne (TK)

Die erneute Sequenzierung des ersten Fragmentes FGFRb_ex zeigte, dass die DNA Sequenz der Compagen Datenbank, innerhalb der letzten 63 Nukleotide (21 AS) mehrere Lesefehler aufwies, durch die das Stop-Codon entstand. Die erneute Analyse der drei Leseraster zeigte, dass an drei Stellen ein T zu viel enthalten war (Abb. 4. 31). Nach deren Entfernung war die Sequenz identisch mit der durch erneute Sequenzierung ermittelten (Abb. 4. 32).

Die fehlende Sequenz von FGFRb, die für Ig III, die Transmembran-Domäne und den N-terminalen Bereich der Tyrosinkinase-Domäne codiert, konnte durch verschiedene Primerkombinationen über PCR erfolgreich aus der cDNA *Hydra* isoliert werden. Der Rasterschub am 5' Ende der FGFRb_in Sequenz wurde durch erneute Sequenzierung, bestätigt. Die Neu-Sequenzierung zeigte weitere Sequenzunterschiede (9 Stück) im Bereich des Rasterschubes. Sodass es für die Aminosäureabfolge im C-terminalen Bereich der Tyrosinkinase-Domäne Bereich zwei Alternativen gibt (Abb. 4.32 B). Die Unterschiede sind möglicherweise auf allelische Heterogenität zurückzuführen.

Die abgeleitete Proteinsequenz für FGFRb besitzt N-terminal ein Signalpeptid zur Verankerung in der Membran (Abb. 4.32 A, B). Die ersten beiden Ig-ähnlichen Schleifen werden über eine Disulfidbrücke gebildet (Abb. 4.32 A, B). Die Transmembran-Domäne und die intrazelluläre zweigeteilte Tyrosinkinase-Domäne vervollständigen diesen *Hydra* FGFR (Abb. 4.32 A, B).

Im Alignment mit FGFRa zeigte, dass die Sequenzen sehr ähnlich zueinander sind (Abb. 4.33). Die Identität der Aminosäure-Sequenz liegt bei 89 %. Während die Transmembran-Domäne zu 100 % identisch ist, finden sich wenige Abweichungen innerhalb der Sequenz des Signalpeptids und der Tyrosinkinase-Domäne (Abb. 4.33). Die Sequenz für Ig III ist zu 94 % identisch, hier sind lediglich 3 AS verschieden. Wie bei FGFRa wird bei FGFRb die dritte Ig-ähnliche Schleife nicht über eine Disulfidbrücke gebildet (Abb. 4.33). Die größten Unterschiede sind innerhalb der Sequenz, die Ig I und Ig II kodiert, und am C-terminalen Ende der Sequenz zu finden (Abb. 4.33).

Trotz der hohen Ähnlichkeit in der Nukleotidsequenz (Anhang-Abb. 7.6) ist es relativ unwahrscheinlich, dass bei der Suche nach den fehlenden Sequenzfragmenten von FGFRb FGFRa isoliert wurde. Zum einen unterscheiden sich die Primer für die Isolierung der cDNA am 3' Ende, welches für eine erfolgreiche PCR Reaktion perfekt passen sollten. Zum anderen finden sich in der amplifizierten Sequenz 39 Unterschiede innerhalb von 1192 Nukleotiden. Dies sind nach den Angaben des Herstellers (ThermoFischer Scientific) für Taq-DNA Polymerase (ein Fehler pro 1000 Nukleotide) bei weitem zu viele, sodass es sich sehr wahrscheinlich nicht um Sequenzierungsfehler handelt.

```

aagtttttttatgtcgcactatgggtcagaattttaactgtccctatatatgttactgcattt      780
  K F F Y V D Y G Q N L T V P I Y V T A F
    S F F M S T M V R I - L S L Y M L L H F      260
      V F L C R L W S E F N C P Y I C Y C I S
ctacctaaccctcacttttcaaatgtttatacgtttacagcatgacaaatccaaa      835
  L P N P H F S N V Y T F T A - Q I Q
    Y L T L T F Q M F I R L Q H D K S K      277
      T - P S L F K C L Y V Y S M T N P

```

Abbildung 4.31: Möglicher Rasterschub an Ende der Compagen-Sequenz FGFRb_ex.

Durch das Weglassen der fett gedruckten Thymine ändert sich das Leseraster. Abgeleitete Proteinsequenzen: blau: Leseraster 1, grün: Leseraster 2, orange: Leseraster 3. Die jeweilige Aminosäure steht immer unter dem mittleren Nukleotid, des codierenden Triplets. Bindestrich: Stop-Codon.

[gesamte Sequenz mit allen drei Leserastern: Anhang-Abb. 7.7]

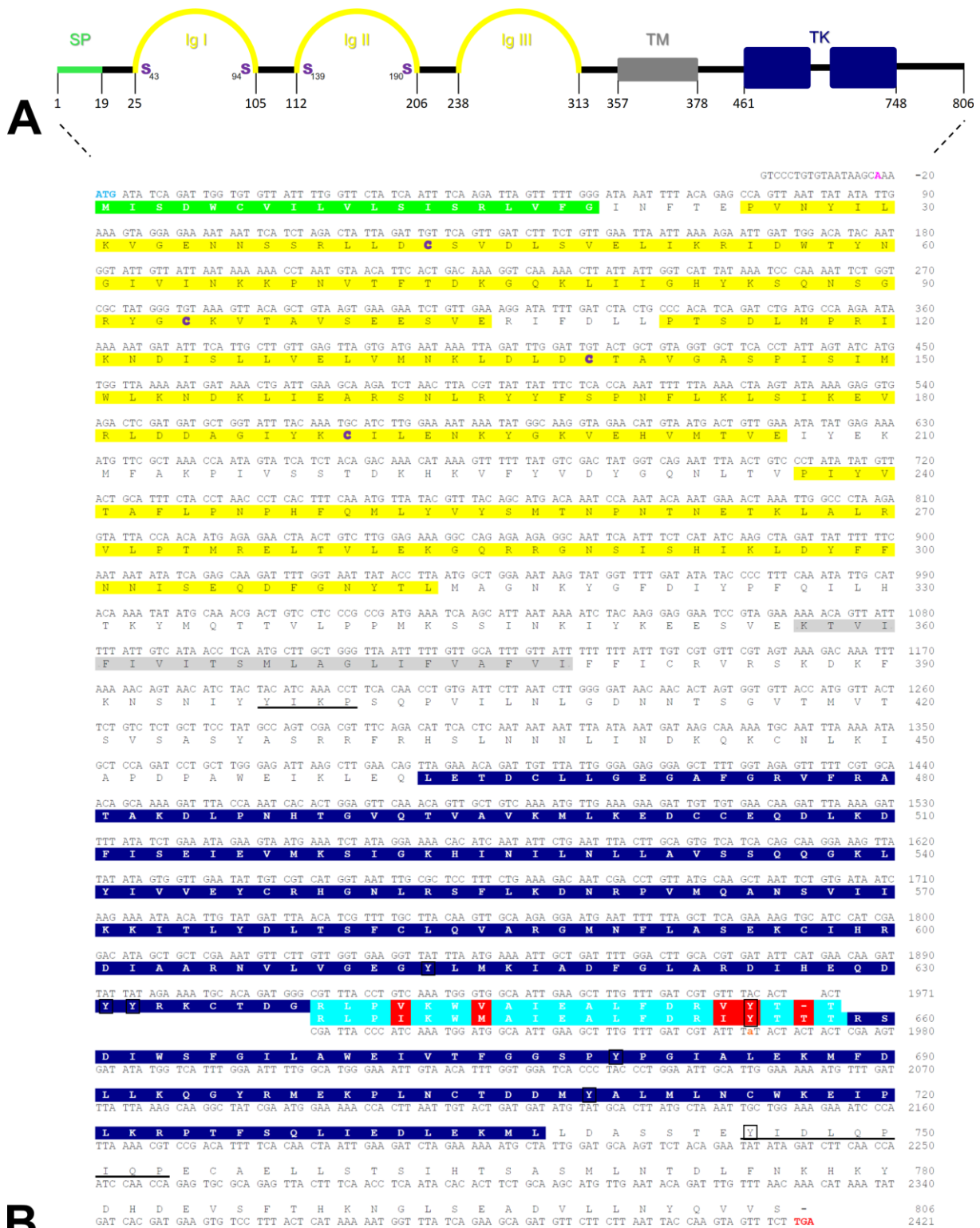


Abbildung 4.32: Struktur und vorhergesagte Proteinsequenz von FGFRb.

(A) Struktur von FGFRb, abgeleitet aus der Proteinsequenz, grün: Signalpeptid (SP), gelb: Ig-ähnlichen Schleifen (Ig I-III), violetten S: Disulfidbrücken, grau: Transmembran-Domäne, dunkelblau: Tyrosinkinase-Domäne; Die Zahlen 1-806 sind die Aminosäuren, die Anfang/Ende einzelner Domänen darstellen. (B) Nukleotid- und daraus abgeleitete Proteinsequenz von FGFRb, Pink: Adenin in -3 vor dem Start-Codon erfüllt Kozak-Kriterium, hellblau: Start-Codon, orange: Rasterschub, rot: Stop-Codon, grün unterlegt: Signalpeptid, gelb unterlegt: Ig-ähnlichen Schleifen I-III, violett: Cysteine für die Bildung Ig-ähnlicher Schleifen, dunkelblau unterlegt: Tyrosinkinase-Domäne, hellblau unterlegt:

Bereich, der Nukleotidunterschiede zwischen Neu-Sequenzierung und Compagen-Sequenz (mit Rasterschub = **a**), rot unterlegt: alternativ vorhergesagte Aminosäuren. Schwarz eingerahmt: Tyrosine die phosphoryliert werden, schwarz unterstrichen: mögliche SH_{2/3} Bindestellen.

[illegible]

▲ Abbildung 4.33: Alignment von FGFRa und der beiden Varianten von FGFRb.

FGFRa: NCBI-Sequenz AAO39416. FGFRb1: Sequenz von FGFRb, erhalten durch Neusequenzierung. FGFRb2: FGFRb Sequenz mit Rasterschub im dem C-terminalen Teil der Tyrosinkinase-Domäne codierenden Abschnitt. FGFRb_Comp: unveränderte Sequenzfragmente (FGFRb_ex und FGFRb_in) aus der Compagen Datenbank. grüne Linie: Signalpeptid, gelbe Linien: Ig-ähnliche Schleifen I-III, graue Linie: Transmembran-Domäne, blaue Linien: Tyrosinkinase-Domäne.

4. 2. 2. 2 Das räumlich-zeitliche Transkriptionsmuster von *fgfr-b* überlappt teilweise mit dem von *fgfr-a*

Wegen der großen Sequenzübereinstimmung von *fgfr-a* und *fgfr-b* und somit einer möglichen Kreuzhybridisierung der Sonden, wurden zwei verschiedene antisense RNA-Sonden für die ISH verwendet. Die Sonde *FGFRb_in* richtet sich gegen den Teil der mRNA, welcher den intrazellulären, C-terminalen Abschnitt der Tyrosinkinase-Domäne codiert. Die Sonde *FGFRb_ex* richtet sich gegen den Teil der mRNA, der den extrazellulären N-terminalen Bereich und die ersten beiden Ig-ähnlichen Schleifen von FGFRb codiert. Zur Kontrolle der Spezifität der Hybridisierung wurden die jeweiligen sense RNA-Sonden verwendet. Bei der ISH mit den jeweiligen sense RNA-Sonden konnte keine Transkription detektiert werden (Daten nicht gezeigt), so dass, wie bei den FGFs davon ausgegangen werden kann, dass die mit den antisense RNA-Sonden detektierte Transkription spezifisch ist.

Bei der ISH mit der antisense RNA-Sonde *FGFRb_in* zeigte sich während der Knospung das gleiche Transkriptionsmuster wie für *fgfr-a* (Daten nicht gezeigt). Die Transkription war ab dem zweiten Knospenstadium in der Spitze der Knospe vorhanden. Diese bleibt bis etwa Stadium 5 erhalten. In diesem Stadium war zusätzlich eine ektodermale Transkription an der Knospenbasis detektierbar. Diese wiederum war, wie bei *fgfr-a*, bis nach Ablösung der Knospe im Elterntier vorhanden.

Die ISH mit der antisense RNA-Sonde *FGFRb_ex* erbrachte ein etwas anderes Muster. Im Gegensatz zu *fgfr-a* und *fgfr-b_in* wurde *fgfr-b_ex* nicht in den frühen Stadien (1-3) der Knospung transkribiert (Abb. 4.34 A, B). Erst in Stadium 4 war eine asymmetrische Transkription ektodermal an der Knospenbasis zu erkennen. Sie begann im oberen Bereich der Knospe mit einigen positiven Zellen (Abb. 4.34 B, F). In Stadium 5 war rund um die Knospenbasis ein Ring aus *fgfr-b* positiven Zellen, wie bei *fgfr-a*, sichtbar (Abb. 4.34 C, G). Dieser Ring grenzte sich im Verlauf der Knospung immer schärfer ab, zum Schluss bildeten nur noch 1-3 *fgfr-b* positive Zellen die Ringlinie (Abb. 4.34 E, H-K, M-O). Nach Ablösung der Knospe blieb ein kleiner Ring aus *fgfr-b* positiven Zellen im Elterntier zurück (Abb. 4.34 L, P).

In adulten knospenlosen Tieren konnte weder mit der Sonde FGFRb_in noch FGFRb_ex eine Transkription nachgewiesen werden.

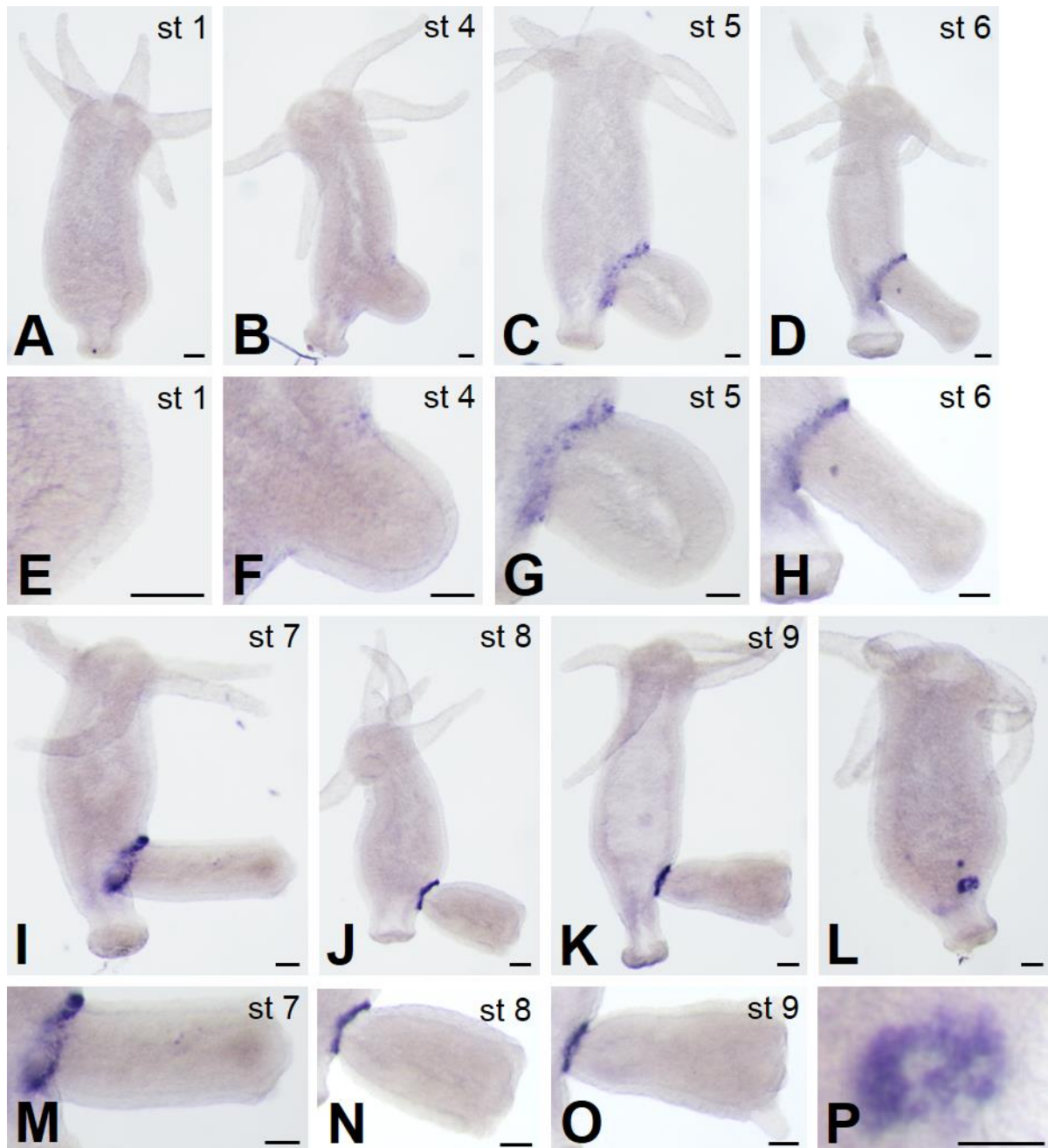


Abbildung 4.34: Transkription von *fgfr-b_ex* während der Knospung bei *Hydra vulgaris* AEP.

(A, E) keine *fgfr-b_ex* Transkription während der Initiationsphase der Knospung. (B-D, F-I, M) *fgfr-b_ex* Transkription während der Elongationsphase der Knospung. (J-K, N-O) *fgfr-b_ex* Transkription während der Ablösungsphase der Knospung. (L, P) *fgfr-b_ex* Transkription nach Knospenablösung. St: Knospenstadium, A-D, I-L Übersichtsaufnahmen, E-H, M-P Detailaufnahmen Knospe, Sonde: FGFRb_ex, Maßbalken: 100 µm.

[Einteilung der Knospenstadien nach Otto und Campbell (1967)]

4. 2. 3. 1 Datenbankrecherche und Strukturanalyse zu einem möglichen HvFGFRL1

Die Datenbank Compagen sagt eine Sequenz (HAEP_T-CDS_v02_4130) für einen FGFRL1 bei *Hydra* (HvFGFRL1) voraus. Die Untersuchung der cDNA zeigte, dass 5' und 3' nichtcodierende Sequenzen vorhanden sind (Abb. 4.35 B). Das ORF wird von einem Start- und einem Stop-Codon flankiert. Das Kozak-Kriterium ist mit einem Guanin in -3 für das Start-Codon erfüllt (Abb. 4.35 B). Ein für alle FGF-Rezeptoren typisches Signalpeptid wird, wie bei den FGFs, nicht von allen Programme vorhergesagt: Signalep4.1 und Phobius erkennen kein Signalpeptid. Predisi sagt ein Signalpeptid, das von AS 1-29 reicht, zur Sekretion (nicht zur Verankerung in der Membran) voraus. Berücksichtigt man zusätzlich die hydrophoben AS in diesem Bereich, so ist ein Signalpeptid vorhanden (Abb. 4.35 B). Das ORF codiert ein Protein von 404 AS, welches drei Ig-ähnlichen Schleifen besitzt (Abb. 4.35 A). Im Gegensatz zu den beiden kanonischen FGFR, die in der Ig-III-codierenden Region kein einziges Cystein enthalten, weist HvFGFRL1 in den entsprechenden Regionen zwei Cysteine auf, sodass Ig III, wie bei den FGF-Rezeptoren aller anderen Tiere, durch kovalente Wechselwirkungen gebildet wird (Abb. 4.35 A). Das Molekulargewicht beträgt 46,6 kDa. Da FGFRL1 bei Wirbeltieren, wie die FGFR1-4, über eine Transmembran-Domäne und eine kurze intrazelluläre Domäne verfügen, wurde nach den fehlenden Sequenzabschnitten gesucht. Weitere Recherchen in anderen Datenbanken (Wenger et al., 2013) sowie direkte Kontaktaufnahme mit I. Wenger, Genf, ergaben, dass HvFGFRL1 wahrscheinlich nur aus den drei Ig-ähnlichen Schleifen besteht und weder eine Transmembran-, noch eine intrazelluläre Domäne besitzt (Abb. 4.35 A, B).

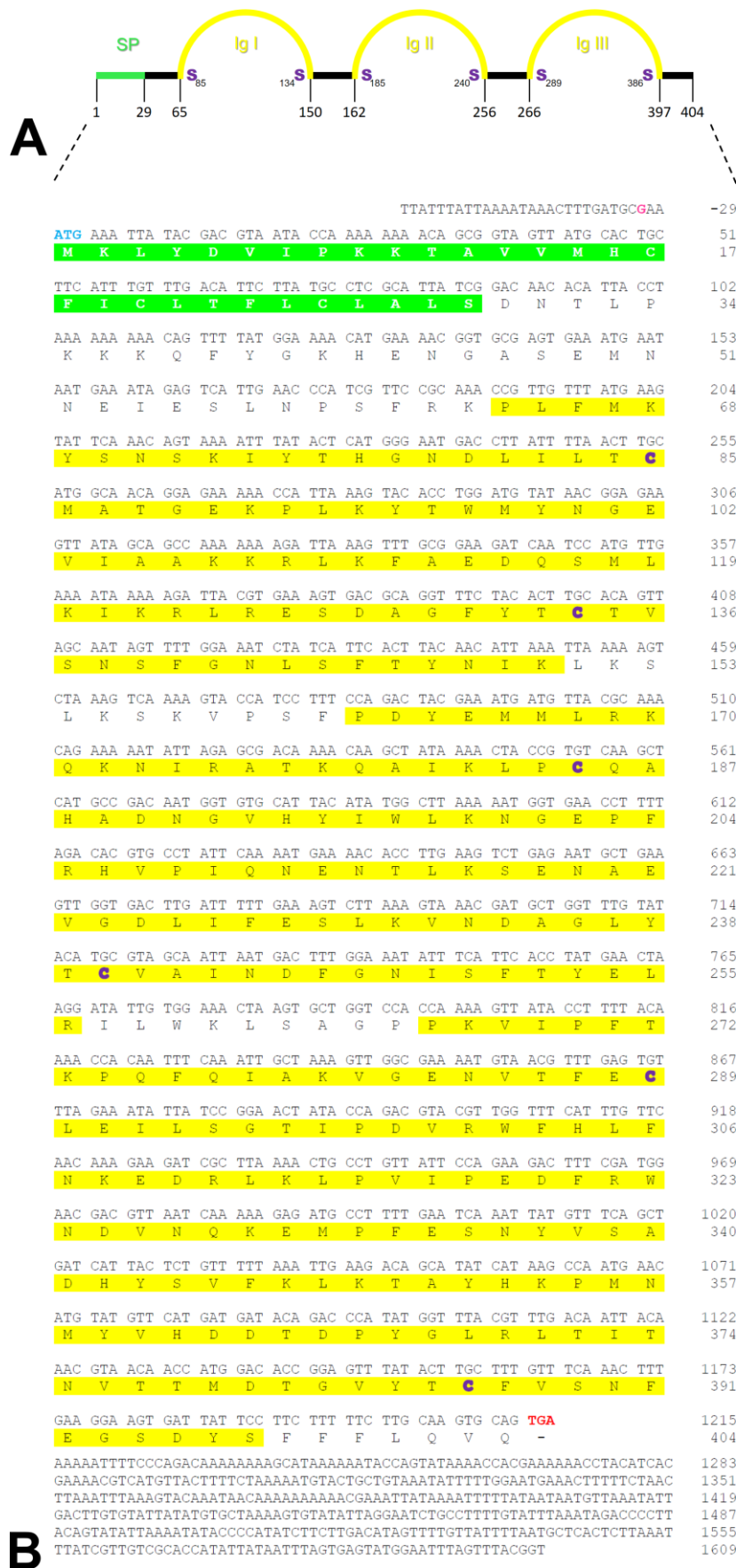


Abbildung 4.35: Struktur und abgeleitete Proteinsequenz von HvFGFRL1.

(A) Struktur von HvFGFRL1, abgeleitet aus der Proteinsequenz. Grün: Signalpeptid (SP), gelb: Ig-ähnlichen Schleifen I-III, violetten S: Disulfidbrücken, Die Zahlen 1-404 sind die Aminosäuren, die Anfang /Ende einzelner Domänen darstellen. (B) Nukleotid- und von abgeleitete Proteinsequenz von HvFGFRL1, Pink: Guanin in -3 vor dem Start-Codon erfüllt Kozak-Kriterium, hellblau: Start-Codon, rot: Stop-Codon, grün unterlegt: Signalpeptid, gelb unterlegt: Ig-ähnlichen Schleifen I-III, violett: Cysteine für die Bildung Ig-ähnlicher Schleifen.

4. 2. 3. 2 Das Transkript von *hvfgrl1* befindet im adulten Tier und während der Knospung hauptsächlich im Bereich der Tentakel

Wie schon zuvor wurde auch für die Detektion des Transkripts von *hvfgrl1* eine antisense RNA-Sonde verwendet. Zur Spezifikation wurde wieder eine sense RNA-Sonde genutzt. Die ISH mit der sense RNA-Sonde zeigte auch hier, dass das Transkriptionsmuster, welches durch die antisense RNA-Sonde detektiert wurde, spezifisch ist. Denn mit der sense RNA-Sonde konnte kein Transkript detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die ISHs mit der antisense RNA-Sonde ergaben, dass *hvfgrl1* bei adulten, knospenlosen Polypen entodermal oberhalb der Tentakel (Abb. 4.36 A, B) und auch zwischen den Tentakeln (Abb. 4.36 C) transkribiert wurde. Zudem scheint entodermal im gesamten Tier transkribiert zu werden (Abb. 4.36 A). Dies zeigte sich bei einer längeren Färbezeit.

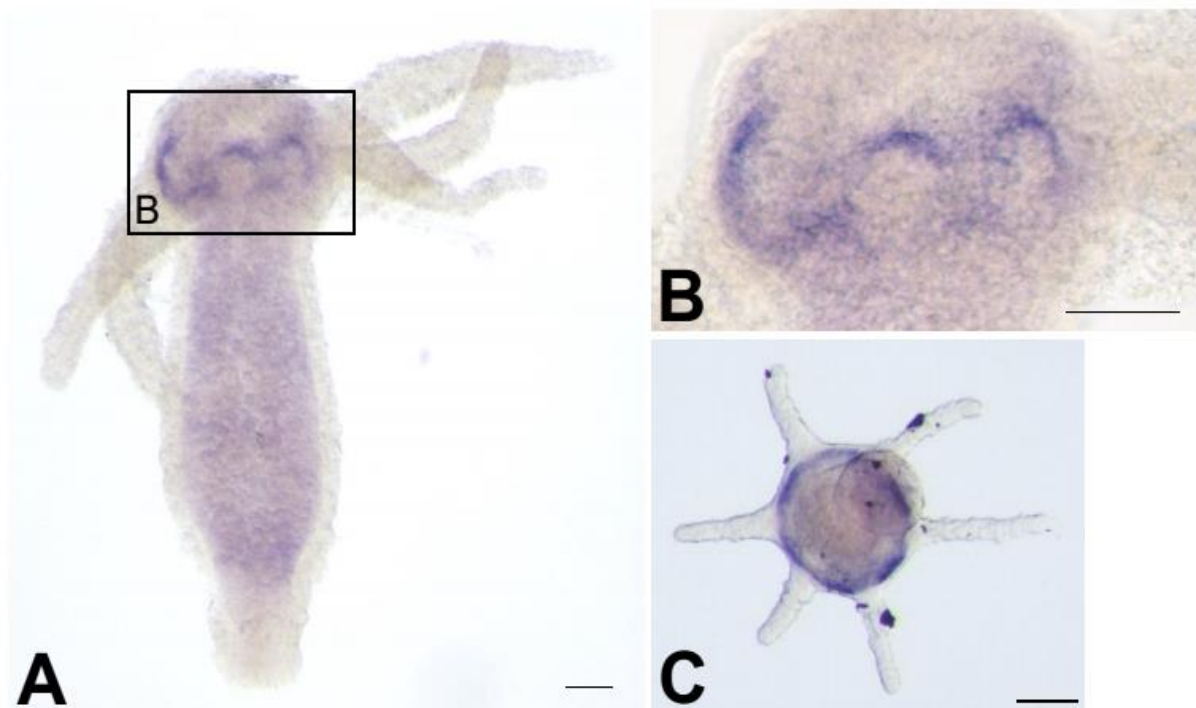


Abbildung 4.36: *hvfgrl1* Transkription in einer adulten knospenlosen *Hydra vulgaris* AEP.

(A) *hvfgrl1* Transkription bei einer adulten knospenlosen *Hydra*. (B) *hvfgrl1* Transkription im Bereich der Tentakel. (C) Köpfchenpräparat: *hvfgrl1* Transkription besonders stark zwischen den Tentakeln. A, C: Übersichtsaufnahmen, B: Detailaufnahme Kopf. Maßbalken: 100 µm.

[Präparate K. Adamkiewicz, BSc]

Während der Knospung wiesen die Knospen in Stadium 1 und 2 keine Transkription auf (Abb. 4.37 A, G). In Stadium 3 wurde *hvfgrl1* zunächst in endodermalen Zellen am apikalen Ende der Knospe im Entoderm transkribiert (Abb. 4.37 B, H). Diese Transkriptionsdomäne

breitete sich bis Stadium 4 von apikal nach basal aus, zudem wurde sie stärker (Abb. 4.37 B-D, H-J). Beim Übergang von Stadium 4 zu 5 fokussierte sich die Transkription wieder auf die Zellen des apikalen Bereiches (Abb. 4.37 E, K). Ab dem späten Stadium 5 bildeten sich zunehmend kleine Bereiche, die keine Transkription von *hvfgrl1* mehr aufwiesen (Abb. 4.37 F, L-P, S-V), bis in Stadium 9 und 10 nur noch, die bei adulten Polypen charakteristischen Transkriptionsdomänen, zwischen und/oder oberhalb der Tentakel vorhanden waren (Abb. 4.37 Q, R, W und X).

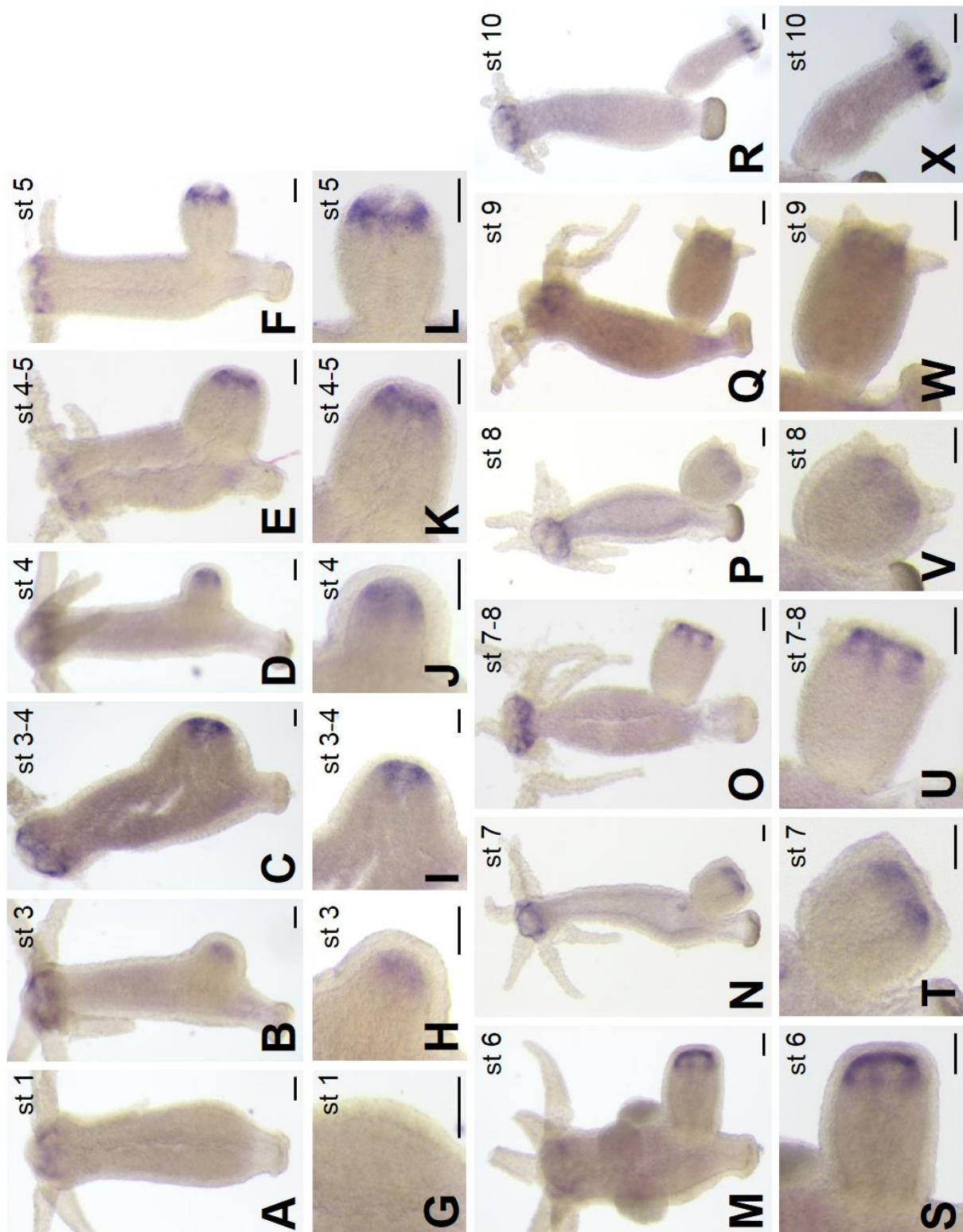


Abbildung 4.37 hvfgfr1 Transkription während der Knospung von *Hydra vulgaris* AEP.

(A-C, G-I) *hvfgfr1* Transkription während der Initiationsphase der Knospung. (D-F, J-N, S-T) *hvfgfr1* Transkription während der Elongationsphase der Knospung. (O-R, U-X) *hvfgfr1* Transkription während der Ablösungsphase der Knospung. A-F, M-R Übersichtsaufnahmen, G-L, S-X Detailaufnahmen Knospe. Maßbalken: 100 µm.

[Präparate: K. Adamkiewicz, BSc]

4. 2. 3. 3 *hvfgrl1* Transkriptionsmuster bei der Regeneration von Kopf und Fuß

Zwischen 4-8 h nach dem Schneiden bei 50 % Körperlänge, war sowohl bei der Regeneration des Kopfes, als auch bei der des Fußes die mRNA ektodermal in Bereich der Schnittstelle vorhanden (Abb. 4.38 A, D, F). Bei der Regeneration des Fußes war ab 12 h bis zur fertigen Entstehung des Fußes keine Transkription mehr vorhanden (Abb. 4.38 H, J, L, N, P, R). Während der Regeneration des Kopfes war die mRNA an der Schnittstelle bis zu 12 h nach dem Schneiden noch nachweisbar (Abb. 4.38 I). Bei 16 h war ein Wechsel der Transkriptionsdomänen von ektodermal zu entodermal zu erkennen (Abb. 4.38 K). 24 h nach dem Schneiden war eine starke Transkription in den apikalen Zellen des Entoderms vorhanden (Abb. 4.38 M). Nach 30 h Regenerationszeit breitete sich die Transkription etwas nach aboral aus und war weniger scharf nach aboral abgegrenzt (Abb. 4.38 O). 36 h nach dem Schneiden erschienen innerhalb der apikalen Transkriptionsdomäne einige Bereiche, die keine Transkription mehr aufwiesen (Abb. 4.38 Q). Nach 48 h Regeneration und mit Bildung erster kleiner Tentakelknospen zeigte sich ein Transkriptionsmuster wie beim adulten Tier. Die mRNA war nun ausschließlich in entodermalen Zellen zwischen und oberhalb der Tentakel lokalisiert (Abb. 4.38 S).

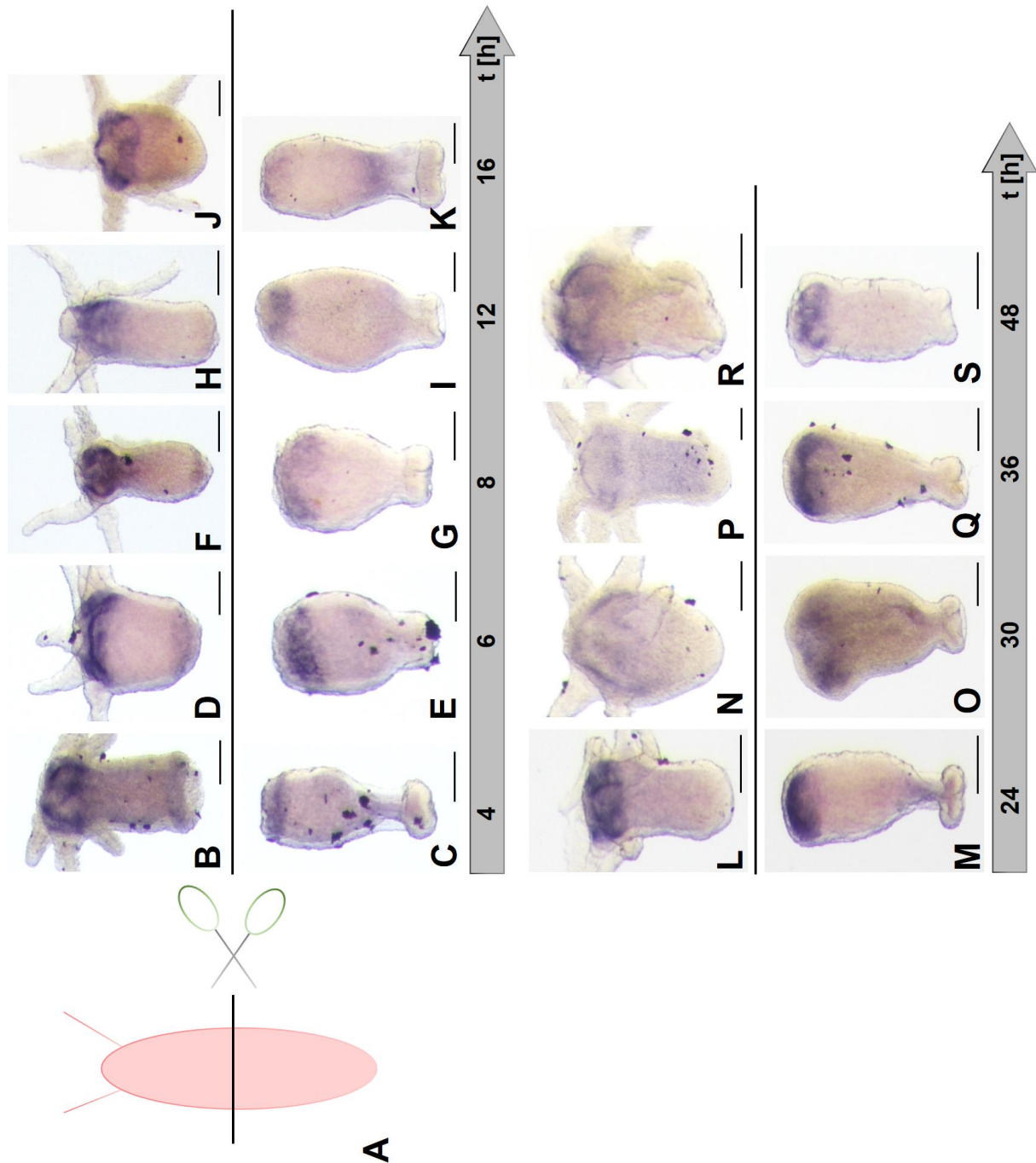


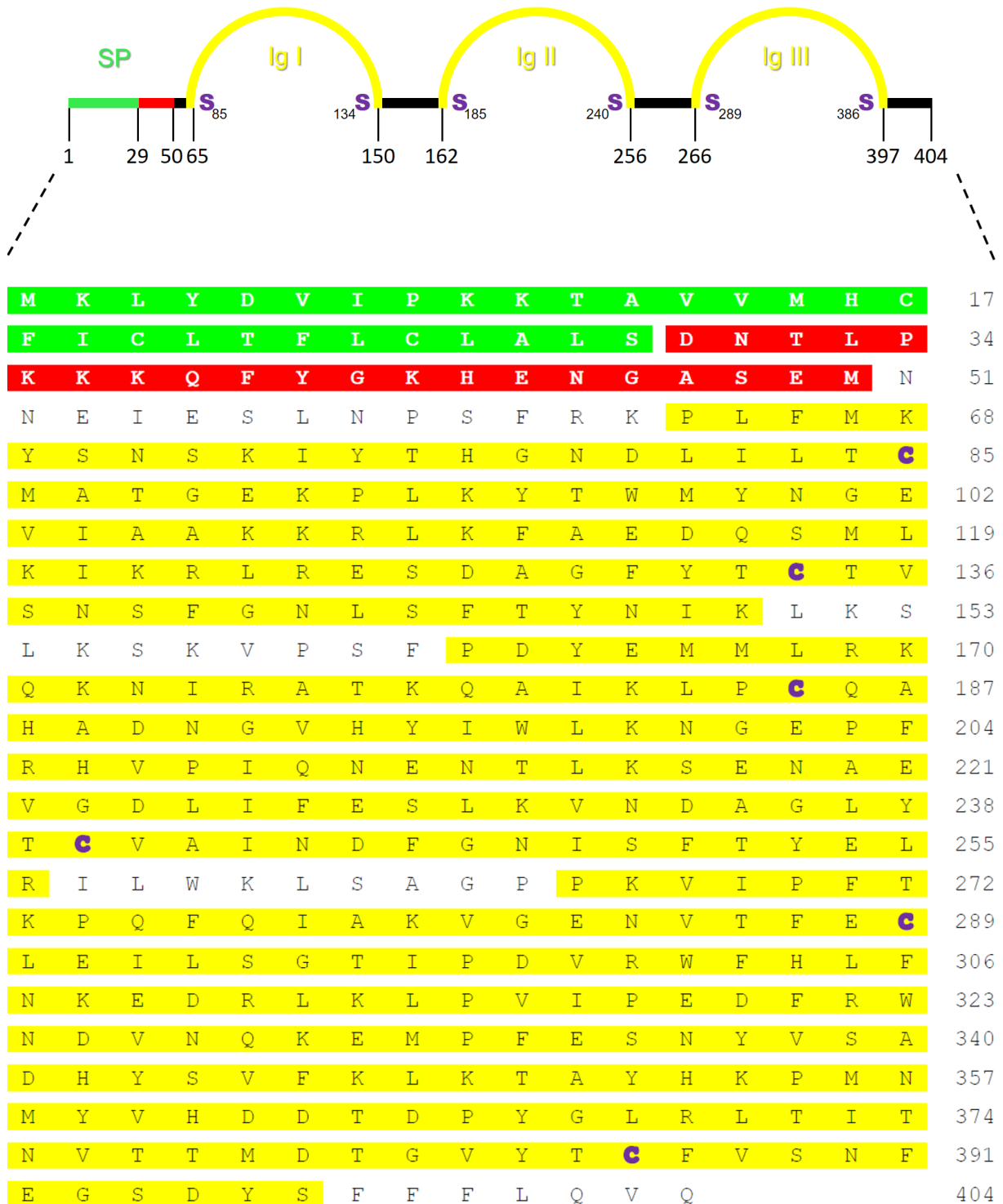
Abbildung 4.38: *hvfgfr1* Transkription während der Regeneration von *Hydra vulgaris* AEP.

(A) Schema zur Herstellung der Regenerate. (B, D, F, H, J, L, N, P, R): *hvfgfr1* Transkription während der Fußregeneration, geschnitten bei 50 % Körperlänge. (C, E, G, I, K, M, O, Q, S): *hvfgfr1* Transkription während der Kopfregeneration, geschnitten bei 50 % Körperlänge. graue Pfeile: Zeitskala mit der jeweilige Regenerationszeit (t) in Stunden (h). B-S: Übersichtsaufnahmen. Maßbalken: 100 µm.

[Präparate: K. Adamkiewicz, BSc]

4. 2. 3. 4 Proteinanalyse von HvFGFRL1

Zur Untersuchung der Lokalisation von HvFGFRL1 wurden zwei polyklonale Antiseren in Kaninchen, gegen ein Epitop zwischen Signalpeptid und Ig I (Abb. 4.39) hergestellt und gegen das Peptid affinitäts gereinigt (Firma Davids Biotechnologie).



▲ Abbildung 4.39: Proteinsequenz von HvFGFRL1 mit Antikörper-Epitop rot unterlegt.

grün unterlegt: Signalpeptid, rot unterlegt: Antikörper-Epitop, gelb unterlegt: Ig I-III, violett: Cysteine, die Disulfidbrücken ausbilden. Die Zahlen 1-404 sind die Aminosäuren, die Anfang/Ende einzelner Domänen darstellen.

4. 2. 3. 4. 1 Western-Blot-Analyse mit einem Peptid-Antikörper gegen HvFGFRL1

Der Antikörper gegen HvFGFRL1 detektierte im Western Blot multiple Banden im Bereich über den gesamten Größenbereich (Abb. 4.40). Für das Protein von HvFGFRL1 wurde eine Bande in der Größe von 46,6 kDa erwartet. Eine Bande in der Größe konnte zwar identifiziert werden, da sie sich in ihrer Stärke jedoch nicht von den anderen unterschied, ist es vermutlich nicht möglich das Protein bei einer Immunhistochemie adulter Tiere zu detektieren bzw. von möglichen anderen Signalen zu unterscheiden. Die Positivkontrolle (Aktin) wies wie erwartet eine Bande in der Größe von 42 kDa auf (Abb. 4.40).

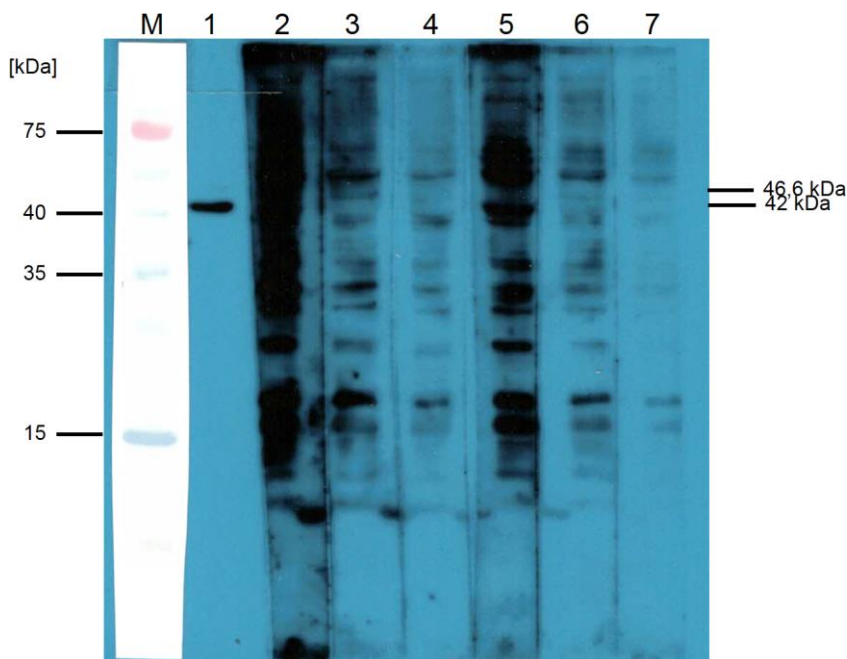


Abbildung 4.40: Western Blot für den Antikörper gegen HvFGFRL1.

Spur M: Page Ruler Prestained Protein Ladder. Spur 1: anti-Aktin (Positivkontrolle), 1:10.000, 42 kDa. Spur 2: anti-HvFGFRL1, 1:100 aus Kaninchen 1. Spur 3: anti-HvFGFRL1, 1:500 aus Kaninchen 1. Spur 4: anti-HvFGFRL1, 1:1000 aus Kaninchen 1. Spur 5: anti-HvFGFRL1, 1:100 aus Kaninchen 2. Spur 6: anti-HvFGFRL1, 1:500 aus Kaninchen 2. Spur 7: anti-HvFGFRL1, 1:1000 aus Kaninchen 2. 46,6 kDa: Größe für erwartete HvFGFRL1 Bande. Für den Nachweis der Chemolumineszenz (ECL) auf Röntgenfilm wurden die zuvor abgeschnittenen und mit verschiedenen Antikörpern behandelten Membranstreifen in ihrer ursprünglichen Reihenfolge wieder zusammengelegt (Abschnitt 3. 2. 14). Belichtungszeit: 2 min.

In der Immunhistochemie an adulten Tieren und Einzelzellpräparaten, unter der Verwendung von verschiedenen Blocklösungen (5 % Casein oder 1 % BSA/Ovalbumin) und unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen (1:100, 1:500 und 1:1000), konnte kein Protein detektiert werden. Die Proben glichen denen der Negativkontrolle, bei der kein Erst-Antikörper verwendet wurde. Derzeit existiert daher kein brauchbarer Antikörper gegen HvFGFRL1.

4. 3 Pharmakologische Behandlungen zur Analyse einer möglichen Regulation der Transkription von *fgf-c* und *fgf-f*

4. 3. 1 Die Behandlung mit dem FGFR-Inhibitor SU5402

Die Transkriptionsmusteranalyse von *fgf-f* zeigte, dass es während der Knospung u.a. auch an der Basis die Knospe transkribiert wird. Aus der Literatur ist zum einen bekannt, dass z.B. beim Auswachsen von Gliedmaßenknospen beim Huhn zu einer positiven Rückkopplung zwischen den FGFs 8 und 10 kommt (Kawakami et al., 2001). Zum anderen konnten Ohshiro et al. (2002) zeigen, dass es eine positive Rückkopplung auf *breathless* durch die Signalübertragung mittels Branchless/Breathless bei *Drosophila melanogaster* gibt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die über den FGF/FGFR- Signalweg vermittelten Signale einen positiven Effekt auf die Transkription von FGF- oder FGFR-codierende Gene haben können (Kim et al., 1998; Liu et al., 2003; Hajihosseini et al., 2004). Daher stellte sich die Frage, ob die Transkription von *fgf-f* an der Knospenbasis möglicherweise über FGFRa reguliert wird. Um dies heraus zu finden wurden Polypen mit einer Knospe in Stadium 3 mit SU5402 behandelt. Hierbei handelt es sich um einen spezifischen Inhibitor für die FGFR Aktivität (Mohammadi et al., 1997). Sudhop et al. (2004) konnten zeigen, dass unter Verwendung von SU5402 für 24 h die Knospen sich zwar normal entwickeln, sich jedoch nicht ablösen. Es entstehen sogenannte „Y-Tiere“. Die Knospen bildeten zudem keinen Fuß oder nur eine kleine Beule seitlich an der Knospe aus. Stadium 3 erwies sich dabei als das sensitivste Stadium. Bei einer Behandlung in diesem Stadium wurde die höchste Zahl an „Y-Tieren“ erreicht. In Bezug auf die Transkription von *fgfr-a* zeigte sich, dass diese entweder nicht mehr oder nur noch fragmentarisch vorhanden war (Sudhop et al., 2004).

4. 3. 1. 1 *fgf-f* Transkription ist an der Knospenbasis von SU5402 behandelten Tieren nicht mehr nachweisbar

Die Behandlung mit SU5402 führte zur Entstehung von „Y-Tieren“. Es entwickelten sich die schon von Sudhop et al. (2004) beschriebenen Phänotypen. Das heißt einige Knospen wiesen den Ansatz eines Fußes auf (Abb. 4.41 A). Bei anderen Tieren entwickelten die Knospen kein Fuß, lediglich die Basis der Knospe hatte sich etwas verengt (Abb. 4.41 B). Ein dritter Phänotyp war, dass sich weder ein Knospenfuß ausgebildet, noch, dass sich die Knospenbasis verengt hatte (Abb. 4.41 C). Die anschließende ISH zeigte, dass die Transkriptionsdomäne von *fgf-f* an der Knospenbasis bei allen drei Phänotypen nicht mehr vorhanden war (Abb. 4.41). Die Transkriptionsdomänen in den Tentakelspitzen, an der Tentakelbasis und in der Basalscheibe waren hingegen noch vorhanden (Abb. 4.41).



Abbildung 4.41: *fgf-f* Transkription bei, durch SU5402 entstandenen, „Y-Tieren“ von *Hydra vulgaris* AEP.

(A) *fgf-f* Transkription bei Y-Phänotyp mit Fußansatz. schwarzer Pfeil: Anlage Knospenfuß. (B) *fgf-f* Transkription bei Y-Phänotyp ohne Ausbildung eines Fußes, mit verlängerter Knospenbasis. (C) *fgf-f* Transkription bei Y-Phänotyp mit breiter Knospenbasis A-C: Übersichtsaufnahme. Maßbalken: 100 μ m.

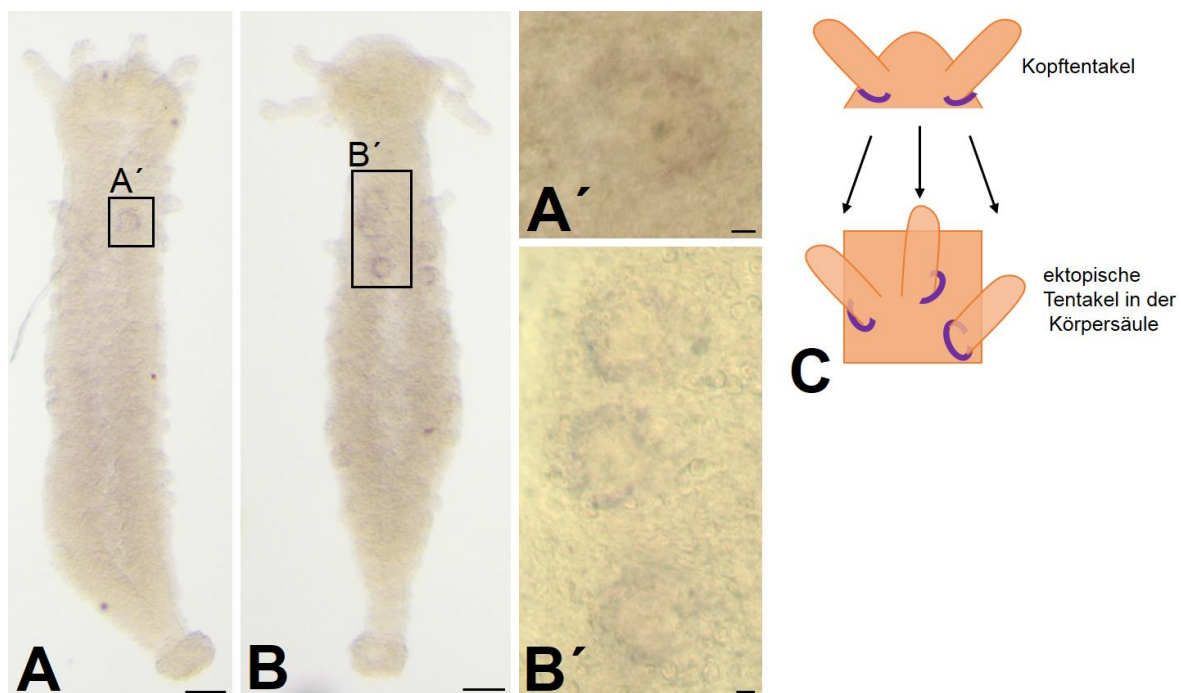
4. 3. 2 Die Behandlung mit Alsterpaullon (ALP) zur Überaktivierung des WNT-Signalwegs

Die Transkriptionsmuster von *fgf-c* und *fgf-f* an der Tentakelbasis und die *fgf-f* Transkription in den Tentakelspitzen und im Hypostom erweckten den Verdacht, dass auch der WNT-Signalweg eine Rolle spielt und beide Gene möglicherweise über WNT reguliert werden.

Denn bei *Hydra* wird unter anderem *hywnt3* im Hypostom transkribiert (Hobmayer et al., 2001, Lengfeld et al., 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass über *hywnt3* ein Kopforganisator gebildet wird (Hobmayer et al., 2001, Lengfeld et al., 2009). Philipp et al., 2009 konnten zeigen, dass es zwei weitere *hywnt* Gene, *hywnt5* und *hywnt8*, gibt, die in der Tentakelspitze bzw. an der Tentakelbasis transkribiert werden. Beide Gene werden auch bei, durch Alsterpaullon (ALP) erzeugten, ektopischen Tentakeln in der Tentakelspitze und an der Basis transkribiert (Philipp et al., 2009). Alsterpaullon ist in der Lage den WNT-Signalweg, auch ohne das Vorhandensein von WNT Molekülen zu aktivieren, was bei *Hydra* zur Ausbildung ektopischer Tentakel und Kopforganisatoren führt (Philipp et al., 2009).

4. 3. 2. 1 *fgf-c* Transkription verändert sich bei Überaktivierung des WNT-Signalwegs

Die ISH für *fgf-c* bei Alsterpaullon behandelten Tieren zeigte, dass die normalerweise vorhandene Transkript unterhalb der Tentakelbasis, bei den eigentlichen Kopftentakeln, nicht mehr detektiert wurde. Hier war auch durch längeres Färben kein Transkript nachweisbar (Abb. 4.42 A, B). Die ektopischen Tentakel zeigten hingegen entweder keine oder eine veränderte Lokalisation des Transkripts. Die mRNA war zwar ektodermal an der Basis der Tentakel lokalisiert, jedoch war der Ring um die Basis teilweise fast geschlossen (Abb. 4.42 B, B') oder die halbkreisförmige Hochregulierung des Gens war nicht unterhalb der Tentakel, sondern seitlich (Abb. 4.42 A, A').



▲Abbildung 4.42: Transkription von *fgf-c* bei *Hydra vulgaris* AEP, nach einer Alsterpaullon-Behandlung.

(A, B): *fgf-c* Transkription bei ALP behandelten Tieren. (A', B'): *fgf-c* Transkription bei ektopischen Tentakel in der Körpersäule. (C) Schema zur Veränderung der *fgf-c* Transkription nach der Behandlung mit ALP. Violett: Verlauf der *fgf-c* Transkription. A-B: Übersichtsaufnahmen, A'-B': Detailaufnahmen ektopischer Tentakel. Maßbalken: A, B: 100 µm, A', B': 10 µm

[Präparate: K. Ohler, BSc]

4. 3. 2. 2 Dynamische *fgf-f* Transkription bei der Entstehung ektopischer Tentakeln durch die Überaktivierung des WNT-Signalwegs

Die Analyse der Tiere, die zwei Tage nach der ALP Behandlung fixiert wurden, zeigte, dass sich morphologisch noch keine ektopischen Tentakel gebildet hatten (Abb. 4.43 B). Teilweise hatten sich bei diesen Polypen Knospen ausgebildet (Abb. 4.43 B). Die Untersuchung der Transkription von *fgf-f* zeigte, bei diesen Tieren, zum einen, dass die normale entodermale Transkription im Hypostom, an der Tentakelbasis und -spitze vorhanden war. Im Bereich der Knospe waren jedoch ektodermal viele Bereiche, in denen die mRNA von *fgf-f* vorhanden war (Abb. 4.43 B, B'). 72 h nach der ALP Behandlung wiesen die Tiere nur sehr kleine ektopische Tentakelknospen, die über die gesamte Körpersäule verteilt waren, auf (Abb. 4.43 C). Hier waren die eigentlichen Kopftentakel stark deformiert, bzw. in ihrer Länge nur noch reduziert vorhanden und transkribierten jetzt auf gesamter Länge entodermal *fgf-f* (Abb. 4.43 C, C'). Mit größer werden der Tentakelknospen (4d nach der ALP Behandlung) war zu erkennen, dass neben der anfänglichen ektodermalen Transkription in den ektopischen Tentakelknospenspitzen nun auch noch eine entodermale Transkription hinzukam (Abb. 4.43 D, D'). Sobald die Tentakelknospen etwas größer wurden, wurde die ektodermale Transkription immer geringer und war schließlich nur noch an der Basis der Tentakelknospe zu erkennen (Abb. 4.43 E, E'). 5 d nach der ALP Behandlung hatten die ektopischen Tentakel an Länge zugenommen und es konnte ektodermal keine Transkription mehr detektiert werden (Abb. 4.43 F, F'). Die Tentakel besaßen nur die entodermale Transkription in der Tentakelspitze (Abb. 4.43 F, F'). Des Weiteren gab es Tiere, bei denen sich lediglich die Kopftentakel verzweigt hatten und die Spitze jeder Verzweigung wies eine entodermale *fgf-f* Transkription auf (Abb. 4.43 G, G'). Auch hier war keine entodermale Transkription an der Tentakelbasis vorhanden (Abb. 4.43 G, G'). Teilweise wurde auch die Basalscheibe der Tiere sowohl morphologisch (Abb. 4.43 B), als auch in der *fgf-f* Transkription beeinflusst. Statt der normalerweise entodermalen Transkription war nun auch ektodermal eine Transkription detektierbar und die Basalscheibe als solches kaum zu erkennen (Abb. 4.43 B, C, C').

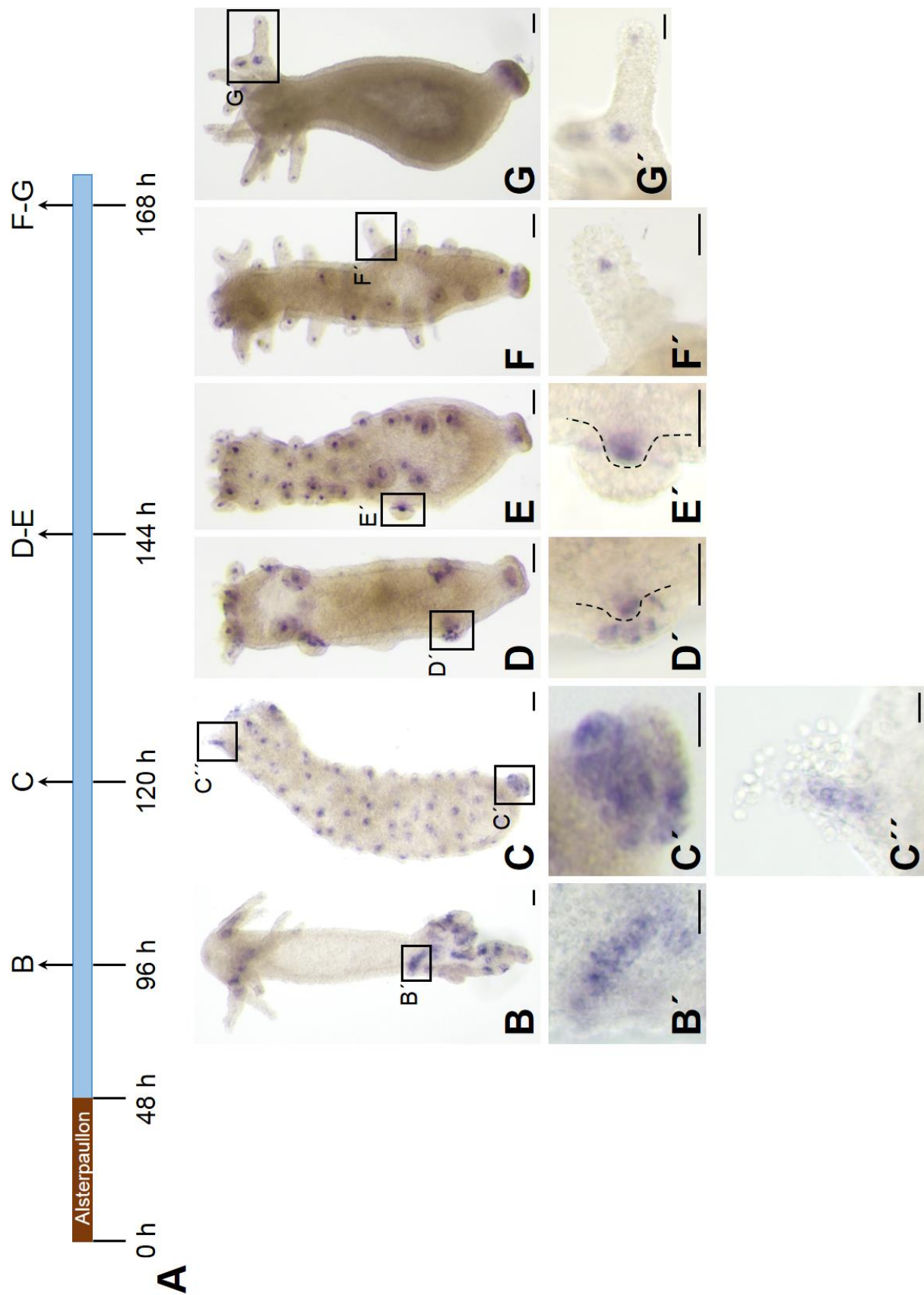


Abbildung 4.43: Transkription von *fgf-f* bei *Hydra vulgaris* AEP, nach einer Alsterpaullon-Behandlung

(A) Versuchsschema zur Behandlung mit APL. Die Tiere wurden zwei Tage mit ALP behandelt und

anschließend zu verschiedenen Zeiten für eine ISH fixiert. (B-G) *fgf-f* Transkription nach einer ALP-Behandlung. (B') Ektopische, ektodermale *fgf-f* Transkription in der Knospungszone. (C') Ektopische und ektodermale *fgf-f* Transkription im Bereich der Basalscheibe. (C'') Entodermale *fgf-f* Transkription in einem Kopftentakel. (D'-F') *fgf-f* Transkription während der Ausbildung ektopischer Tentakel. (G') *fgf-f* Transkription in einem verzweigten Kopftentakel. Gestichelte Linie: Mesogloea, B-G: Übersichtsaufnahme, B'-G', C'': Detailaufnahmen Knospungszone, Tentakel und Basalscheibe. Maßbalken: B-G: 100 µm, B'-G', C'': 50 µm.

4. 3. 2. 3 Die Transkription *hvfgrl1* verändert sich sehr stark bei Überaktivierung des WNT-Signalwegs

Die Ergebnisse für *fgf-c* und *fgf-f*, aus der pharmakologischen Behandlung mit ALP legten die Vermutung nahe, dass auch die Transkription von *hvfgrl1* sich durch das Auswachsen ektopischer Tentakel ändern könnte. Daher wurden auch ALP behandelte Tiere für eine ISH gegen *hvfgrl1* fixiert.

Wie schon bei *fgf-c* und *fgf-f* änderte sich auch bei *hvfgrl1* das Transkriptionsmuster. Bei manchen Polypen, die zwei Tage nach der Behandlung fixiert wurden und noch keine ektopischen Tentakel ausgebildet hatten, war die Transkription *hvfgrl1* in der gesamten Körpersäule entodermal hochreguliert (Abb. 4.44 B). Andere Polypen wiesen nur eine entodermale Transkription in der unteren Körperhälfte auf (Abb. 4.44 C). Es war zu sehen, dass diese nicht homogen war, sondern immer wieder kleine, runde Bereiche vorhanden waren, die keine Transkription aufwiesen (Abb. 4.44 B, C, C'). Die eigentlichen Kopftentakel wiesen entweder keine oder auf gesamter Länge entodermal die mRNA auf (Abb. 4.44 B, C). Polypen, die drei Tage nach der Behandlung fixiert wurden, zeigten das gleiche Muster wie die Polypen, die nach 2 d fixiert waren. Bei einigen Tieren wurde *hvfgrl1* in der gesamten Körpersäule und bei anderen nur in der unteren Hälfte transkribiert (Abb. 4.44 D, D'). Auch die Bereiche, in denen keine Transkription zu detektieren war, waren vorhanden. Jetzt war jedoch zu erkennen, dass an diesen Stellen Tentakel ausgewachsen waren (Abb. 4.44 D, D'). Vier Tage nach der Behandlung mit ALP war die Transkription von *hvfgrl1* in der gesamten Körpersäule sehr stark (Abb. 4.44 E). Im Gegensatz zu den Kopftentakeln konnte innerhalb der ektopischen Tentakel keine *hvfgrl1* Transkription detektiert werden (Abb. 4.44 E'). Erst die Tentakel der Polypen, die 5 Tage Zeit hatten sich zu entwickeln, wiesen auf gesamter Länge eine *hvfgrl1* Transkription auf (Abb. 4.44 F). Die Transkription in der Körpersäule wurde dagegen von oral nach aboral schwächer (Abb. 4.44 F).

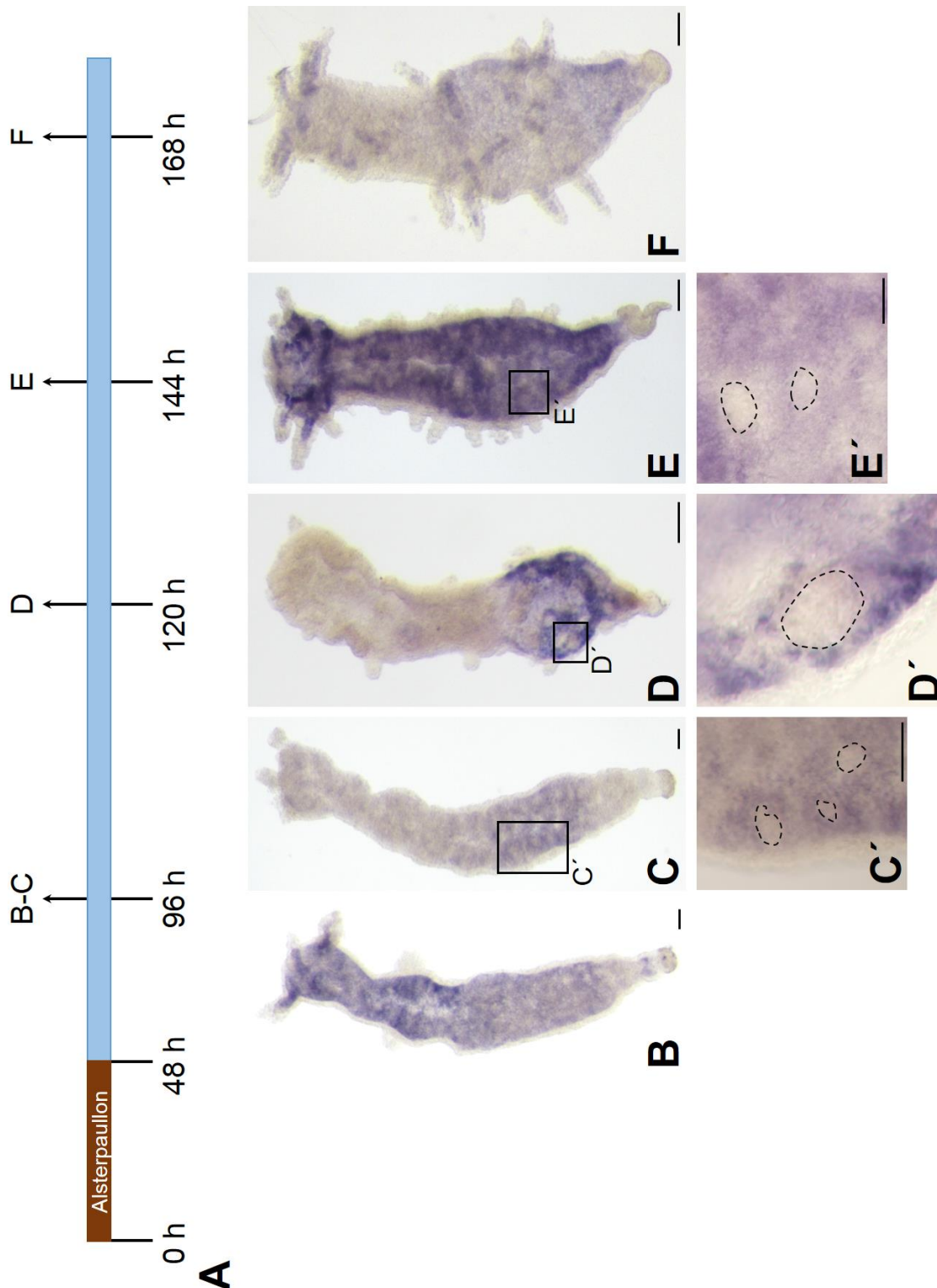


Abbildung 4.44: Transkription von *hvfgfrl1* bei *Hydra vulgaris* AEP, nach einer Alsterpaullon-Behandlung.

(A) Versuchsschema zur Behandlung mit APL. Die Tiere wurden zwei Tage mit APL behandelt und anschließend zu verschiedenen Zeiten für eine ISH fixiert. (B-F) *hvfgfrl1* Transkription nach einer APL-Behandlung. (C'-E') Ektopische, entodermale *hvfgfrl1* Transkription im Bereich der unteren Körperhälfte. B-F: Übersichtsaufnahmen, C'-E': Detailaufnahmen untere Körperhälfte. Gestrichelte Kreise: Bereich ohne *hvfgfrl1* Transkription. Maßbalken: 100 µm.

[Präparate D, E: K. Adamkiewicz, BSc]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *Hydra vulgaris* AEP unter anderem die FGFs FGF-a, FGF-c, FGF-e und FGF-f besitzt. Des Weiteren verfügt *Hydra vulgaris* AEP über zwei kanonische FGF-Rezeptoren (FGFRa und FGFRb) und einen nicht kanonischen FGFR (HvFGFRL1).

Die FGFs *fgf-a*, *fgf-c* und *fgf-e* werden überlappend ektodermal im Stiel von *Hydra vulgaris* AEP transkribiert. Des Weiteren wird *fgf-a* ektodermal in den Tentakelspitzen und während der Knospung mit Ausbildung des Stiels in Stadium 9 transkribiert. Ebenfalls ektodermal im Tentakel unterhalb der Basis wird *fgf-c* transkribiert. Im Verlauf der Knospung wird *fgf-c* zum einen mit Entstehung der Tentakelknospen an der Tentakelbasis transkribiert, und zum anderen ab Stadium 9 mit Entstehung des Stiels an der Basis der Knospe transkribiert. *fgf-e* wird während des gesamten Vorgangs der Knospung, zunächst bis einschließlich Stadium 6, in der Spitze der Knospe und ab Stadium 4 auch an der Basis der Knospe transkribiert. Das komplexeste Transkriptionsmuster weist *fgf-f* auf. Es wird entodermal im Hypostom, in den Tentakelspitzen, an der Tentakelbasis und in der Basalscheibe transkribiert. Während der Knospung wird es zunächst ektodermal, beginnend in Stadium 3, in der Spitze der Knospe transkribiert. Beim Übergang von Stadium 5 zu 6 wechselt die Transkription von ektodermal zu entodermal und befindet sich dann nur noch in den Tentakel. Zusätzlich wird ab Stadium 5 eine weitere ektodermale Transkriptionsdomäne an der Basis der Knospe sichtbar. Diese ist in Stadium 10 nicht mehr nachweisbar und eine entodermale Transkription in der Basalscheibe ist erkennbar. Zusätzlich werden die FGFs *fgf-c*, *fgf-e* und *fgf-f* noch während der Ausbildung der Testes transkribiert.

Die beiden kanonischen FGF-Rezeptoren FGFRa und FGFRb besitzen den FGF-Rezeptor typischen Aufbau, wobei Ig III nicht über Cysteine gebildet wird. Der nicht kanonische FGFR HvFGFRL1 scheint nur eine extrazelluläre Domäne, bestehend aus drei Ig-ähnlichen Schleifen, zu besitzen. Wobei alle drei Schleifen, im Gegensatz zu FGFRa und b, über Cysteine gebildet werden. *fgfr-a* wird zunächst während der Knospung bis einschließlich Stadium 5 in der Knospenspitze transkribiert und ab Stadium 5 ringförmig an der Knospenbasis (Sudhop et al., 2004). *fgfr-b* wird erst ab Stadium 5 nur an der Knospenbasis transkribiert. Sowohl *fgfr-a*, als auch *fgfr-b* werden ektodermal transkribiert. *hvfgrl1* wird dagegen entodermal schwach im ganzen Tier und stark zwischen und/oder oberhalb der Tentakel transkribiert.

5 Diskussion

Der FGF/FGFR-Signalweg ist an vielen Prozessen, wie zum Beispiel der Zellwanderung während der Gastrulation, der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung, aber auch an der Homöostase im adulten Tier beteiligt (Ornitz und Itoh, 2015). Es handelt sich um einen evolutiv konservierten Signalweg, der auch bei basalen Tierstämmen, wie den Cnidaria vorhanden ist. Bei *Nematostella vectensis* (Anthozoa) wurden 15 FGFs identifiziert, von denen zwei in die FGF 8/17/18/24 Unterfamilie gruppiert werden. Zudem sind 2 FGF-Rezeptoren NvFGFRa und NvFGFRb bekannt (Matus et al., 2007; Rentzsch et al., 2008). Bei *Hydra vulgaris* AEP (Hydrozoa) konnte bisher ein FGF (HvFGF1/2) identifiziert werden, welches nahe der FGF Unterfamilie 1/2 eingruppiert werden kann. Zudem wurden zwei FGF-Rezeptoren gefunden (Sudhop et al., 2004; Rudolf et al., 2013). Für FGFRa von *Hydra vulgaris* AEP konnte gezeigt werden, dass dieser an der Ablösung der Knospe essentiell beteiligt ist (Hasse et al., 2014). Während der Knospung laufen verschiedene Musterbildungsprozesse, ähnlich wie bei der Embryonalentwicklung, von Gewebewanderung bis Morphogenese ab. Daher eignet sich *Hydra* sehr gut, um weitere Erkenntnisse über den FGF/FGFR-Signalweg in Bezug auf Funktion und evolutive Entwicklung zugewinnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach weiteren FGFs und FGF-Rezeptoren bei *Hydra* gesucht. Diese wurden anschließend charakterisiert, ihre Transkriptionsmuster und z.T. die Lokalisation des Proteins analysiert, um so mögliche Aussagen über ihre Funktion und die Evolution des FGF/FGFR-Signalweges treffen zu können.

5. 1 Die phylogenetische Zuordnung der *Hydra* FGFs deutet auf drei ursprüngliche FGFs hin

Über die Entstehung bzw. die Evolution von FGFs wurden bereits verschiedene Hypothesen aufgestellt. So vertraten Itoh und Ornitz (2011) die Position, dass ein Vorläufer der heutigen Gruppe der intrakrinen FGFs (FGFs 11-14) der ursprünglichste ist und alle anderen aus ihm hervorgegangen sind. Oulion et al. (2012) postulierten, dass die Vorläufer der heutigen Unterfamilien 1/2 und 8/17/18/24 die ursprünglichsten FGFs darstellen (Abb. 5.1 B). Die heutige Zahl der Unterfamilien bei Vertebraten sei dabei aufgrund von 2 Runden von Genomduplikation während der Evolution der Vertebraten entstanden (Ohno, 1999). Auch Popovici et al. (2005) gehen davon aus, dass ursprünglich aus ein bis drei archeo-FGFs bis zu acht proto-FGFs entstanden sind, aus denen sich letztlich die heutigen FGF Unterfamilien der Vertebraten mit ihren Mitgliedern entwickelt haben. Der umgekehrte Fall, dass der gemeinsame Vorfahr der Radiata und Bilateria bereits alle Vorläufer der heutigen FGF

Unterfamilien besaß und diese durch verschiedene Duplikations- und Verlustereignisse wieder verloren gingen, lässt sich allerdings auch nicht ausschließen (Oulion et al., 2012).

Betrachtet man die Gruppierung der bei *Hydra vulgaris* AEP gefundenen FGFs, so lassen diese sich nahe der bzw. in die FGF Unterfamilien 1/2, 8/17/18/24 und 11/12/13/14 einordnen. Hierbei werden die FGFs FGF-f und FGF-a eindeutig in die FGF Unterfamilien 8/17/18/24 und 11/12/13/14 gruppiert. Die FGFs FGF-b, FGF-c und FGF-e sind nahe der Unterfamilie 1/2 einzuordnen. Eine eindeutige Eingruppierung war nicht möglich. Zudem ist es nicht ganz auszuschließen, dass es auch *long branch attraction* gibt. Die weiteren *Cnidaria* FGFs, zum Beispiel die anderer *Hydra* Arten und auch die FGFs von *Nematostella vectensis* werden ebenfalls in oder nahe der Unterfamilien 1/2, 8/17/18/24 und 11/12/13/14 eingruppiert. Diese Einordnung legt die Vermutung nahe, dass der gemeinsame Vorfahr der Radiata und Bilateria 3 FGFs hatte, die später die Unterfamilien 1/2, 8/17/18/24 und 11/12/13/14 bildeten (Abb. 5.1 A). Dies würde die Thesen von Popovici et al. (2005) und Oulion et al. (2012) unterstützen, die zum einen davon ausgehen, dass es mit Entstehung der Eumetazoa nur wenige FGFs gab und zum anderen, dass FGF1/2 und 8/17/18/24 zu den ursprünglichen Gruppen gehört. Teilweise würde damit aber auch die Aussage von Itoh und Ornitz (2011) gestützt, dass die intrakrinen FGFs eine ursprüngliche Gruppe sind. Im Fall der hier vorliegenden Daten sind die intrakrinen FGFs allerdings nicht die ursprünglichste Gruppe, aus denen allen anderen hervorgegangen sind (Itoh und Ornitz, 2011), sondern eine von drei Gruppen.

Die phylogenetische Untersuchung zeigt auch, dass es innerhalb der *Cnidaria* spezifische Duplikationsereignisse gegeben haben muss, denn in allen drei Unterfamilien (1/2, 8/17/18/24 und 11/12/13/14) sind mehrere *Cnidaria* FGFs, sowohl von *Hydra*, als auch von *Nematostella*, vorhanden. Der genaue Zusammenhang, ob es sich um unabhängige Duplikationen innerhalb der einzelnen *Cnidaria* Arten oder um Duplikationen handelt, die beim Vorfahr der *Cnidaria* aufgetreten sind, lässt sich innerhalb dieser Arbeit nicht sagen.



▲ Abbildung 5.1: Vergleich der Evolutionsszenarien mit und ohne Einbeziehung der bei *Hydra vulgaris* AEP gefundenen FGFs.

(A) Evolutives Szenario unter Einbeziehung der bei *Hydra vulgaris* AEP identifizierten FGFs (B) Evolutives Szenario ohne Einbeziehung der bei *Hydra vulgaris* AEP identifizierten FGFs. E: Vorläufer der Eumetazoa, B: Vorläufer der Bilateria, P: Vorläufer der Protostomia, D: Vorläufer der Deuterostomia. Graue Box: heutiges minimales Genset, grüne Boxen: Eumetazoa-Vorläufer startet mit minimalen FGF-Set bestehend aus drei bzw. zwei FGF-Vorläufer, blaue Boxen: mit Entstehung der Bilateria, sowie Proto- und Deuterostomia kommen weitere FGF-Vorläufer hinzu. Dreiecke: Verlust bestimmter FGFs (Farbcode beachten). +Bnl: Arthropoden-spezifisches FGF Branchless.

[verändert nach: Oulion et al., 2012]

5. 2 Sequenzähnlichkeiten zwischen FGFRa und FGFRb von *Hydra vulgaris* AEP deuten auf linienspezifische Duplikation hin

Betrachtet man die Proteinsequenzen von FGFRa und FGFRb von *Hydra*, so sind sie sich zu 89 % ähnlich. Dies unterstützt die Annahme, dass die FGF-Rezeptoren der Invertebraten im Laufe der Evolution durch unabhängige, linienspezifische Duplikation entstanden sind (Coulier et al., 1997).

5. 3 Die Transkriptionsmuster der *Hydra vulgaris* AEP FGFs und FGF-Rezeptoren deuten auf vielfältige und komplexe Funktionen des FGF/FGFR-Signalwegs in *Hydra vulgaris* AEP hin

Trotz des diploblastischen Körperaufbaus und der einfachen Radiärsymmetrie, stellt *Hydra* eine sehr komplexe Lebensform dar. Die Zellen proliferieren und differenzieren sich zum Teil ständig. Es gehen konstant Zellen verloren und es findet dauerhaft aktive, aber auch passive Wanderung von Zellen oder ganzem Gewebeschnitten mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten statt (Abb. 5.2 A) (Campbell, 1967a, b). Wie schon gesagt besitzt *Hydra* von oral nach aboral sechs morphologische Grenzen (Abb. 5. 2 A) (Böttger und Hassel, 2012). Diese sind: I: die Mundöffnung, II: zwischen Hypostom und den Tentakeln, IIIa: zwischen auswachsendem Tentakel und Tentakelzone, IIIb: zwischen Tentakelzone und Körpersäule, IV: zwischen der Körpersäule und dem Stiel, V: zwischen dem Stiel und der Basalscheibe, VI (nicht dauerhaft vorhanden, nur bei knospenden Tieren): zwischen Elterntier und Knospe (Abb. 5.2 A). Diesen sechs Grenzen kann noch eine zweite, nicht dauerhafte Grenze hinzugefügt werden, und zwar die Grenze zwischen Körpersäule und Gonade, z.B. Testes (Abb. 5.2 A: VII).

Betrachtet man die Genexpressionsmuster der, im Rahmen dieser Arbeit, isolierten FGFs und FGF-Rezeptoren, so lassen diese auf komplexe und vielfältige Funktionen schließen. Die aus *Hydra vulgaris* AEP isolierten FGFs und auch die Rezeptoren zeigen im Vergleich z.T. deutlich voneinander unterscheidbare, aber auch überlappende Transkriptionsmuster (Abb. 5. 2 B).

Die Transkriptionsbereiche der FGFs und der FGF-Rezeptoren befinden sich z.T. im Bereich der morphologischen Grenzen und an Stellen, wo Zellen hinwandern oder sich differenzieren (Abb. 5.2 B). Die Ergebnisse der Untersuchung der FGFs und FGF-Rezeptoren sollen daher im Nachfolgenden auf typische über den FGF/FGFR-Signalweg vermittelte Funktionen, wie Zellmigration durch Chemoattraktion, Zelldifferenzierung und Zelladhäsion, hin diskutiert werden.

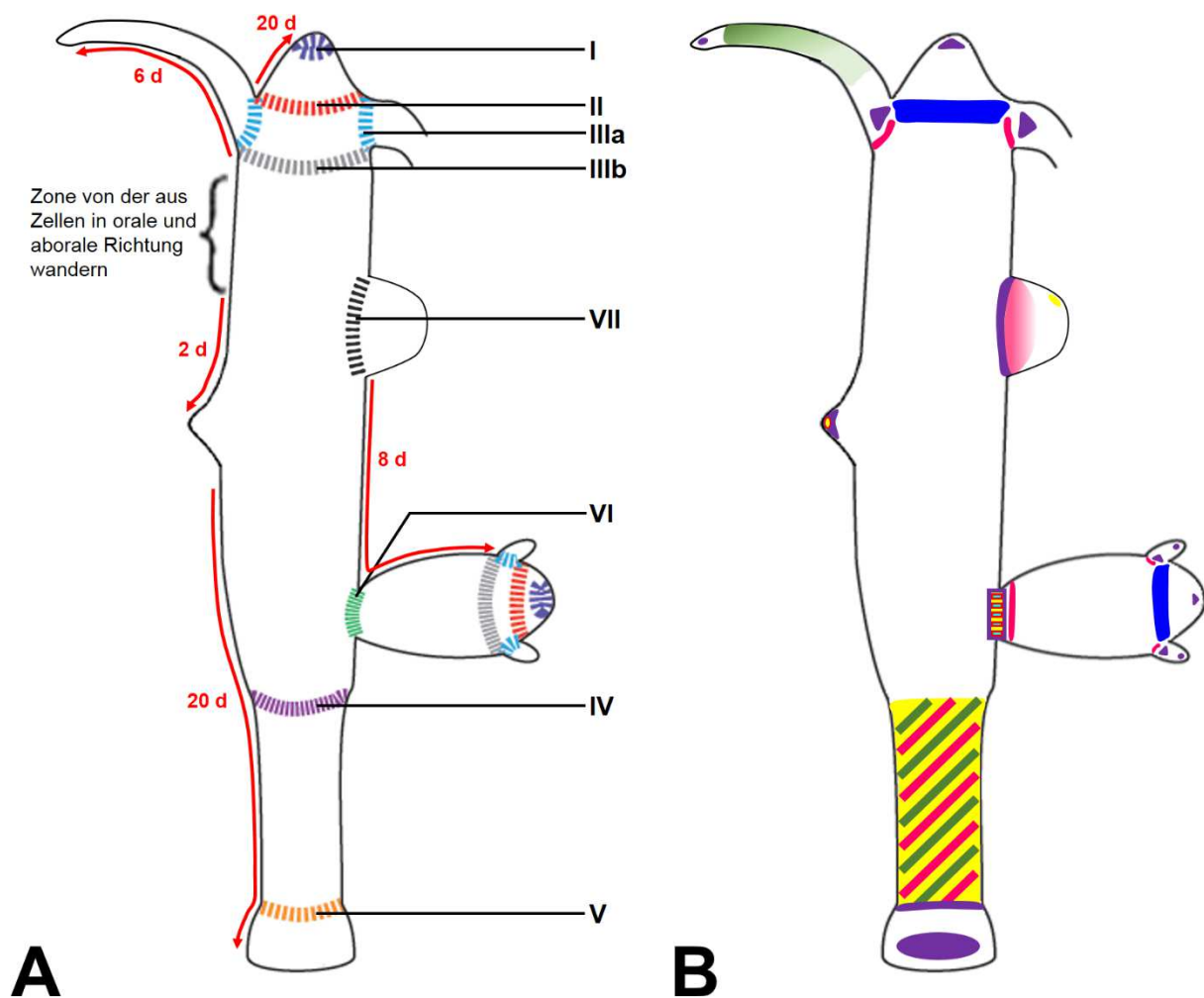


Abbildung 5.2: Schemata zu Grenzen, Epithelzellmigrationsgeschwindigkeiten und FGF/FGFR Transkriptionsdomänen in *Hydra vulgaris* AEP.

(A) Schema zu morphologischen Grenzen in *Hydra*, inklusive Zellmigrationsgeschwindigkeiten. I: Hypostomspitze, Mundöffnung, II: Grenze zwischen Hypostom und Tentakeln, IIIa: Grenze zwischen Tentakel und Tentakelzone, IIIb: Grenze zwischen Tentakelzone und Körpersäule, IV: Grenze zwischen Körpersäule und Stiel, V: Grenze zwischen Stiel und Basalscheibe, VI: Grenze zwischen Elterntier und Knospe, VII: Grenze zwischen Körpersäule und Testes; rote Pfeile: Wanderungsrichtung der Zellen/des Gewebes, mit der Dauer in Tagen (d). (B) Schema zu den Transkriptionsdomänen von *fgf-a* bis *fgf-f* und von *fgfr-a*, *-b* und *hvfgfr11*. Grün: *fgf-a* Transkription (ektodermal), pink: *fgf-c* Transkription (ektodermal), gelb: *fgf-e* Transkription (ektodermal), lila: *fgf-f* Transkription (im adulten Tier entodermal, während der Knospung ento- und ektodermal, in Testes ektodermal), rot: *fgfr-a* Transkription (ektodermal), türkis: *fgfr-b* Transkription (ektodermal), blau: *hvfgfr11* (entodermal).

[verändert nach: Böttger und Hassel, 2012]

5. 3. 1 FGF-a, ein möglicherweise intrakrines FGF

Unter Berücksichtigung der Zuordnung im Stammbaum könnte es sich bei FGF-a um ein intrazellulär agierendes, Neuronen-spezifisches FGF handeln, da es in die Unterfamilie 11/12/13/14 eingruppiert wird. Ebenfalls dafür, dass FGF-a intrazellulär agieren könnte, spricht das eindeutig fehlende Signalpeptid, welches die Sekretion vermitteln würde. Für die intrakrinen FGFs der Vertebraten ist bekannt, dass sie intrazellulär agieren und spannungsabhängige Natriumkanäle in Neuronen steuern und *knockouts* zu Bewegungsstörungen und neuronalen Migrationsdefekten führen (Goldfarb et al., 2007; Itoh und Ornitz 2011; Zhang et al. 2012). Ausgehend von der Lokalisation des Transkripts (Abb. 5.2 B), könnte es sich um sensorische Neurone handeln, denn diese treten unter anderem verstärkt in den Tentakeln und der Basalscheibe auf (Koizumi, 2002). Aber der eindeutige Beweis, dass die Transkription in Neuronen ist, fehlt.

5. 3. 2. 1 Transkription von *fgf-c* spricht eher für ein Differenzierungssignal als für Chemoattraktion

FGF-c gruppiert sich zu den parakrinen FGFs, was darauf schließen lässt, dass es sekretiert wird und möglicherweise sehr lokal wirkt. Gegen eine mögliche Sekretion spricht, dass FGF-c kein nachweisbares Signalpeptid besitzt. Da es aber phylogenetisch nahe der Unterfamilie 1/2 eingruppiert wird, ist es möglich, dass es auf andere Weise, wie z.B. das Wirbeltier FGF1 und 2, mittels Exozytose sekretiert wird (Prochiantz und Théodore, 1995). Die Transkription von *fgf-c* ist asymmetrisch, ektodermal in einem Halbkreis, unterhalb der Tentakelbasis und kreisförmig oberhalb der Basalscheibe lokalisiert (Abb. 5.2 B). Die asymmetrische Transkription, die nur unterhalb der Tentakelbasis stattfindet, könnte zeigen, dass die Bildung der Tentakel bzw. das Auswachsen der Tentakel von aboraler Richtung aus erfolgt. Ähnliches kann während der Bildung des Knospenfußes im Falle von *shin-guard* und *manacle* beobachtet werden, beide werden ebenfalls asymmetrisch, nur im unteren Bereich des sich bildenden Fußes transkribiert (Bötter und Hassel, 2012).

Eine mögliche Funktion von FGF-c könnte im Bereich der Anlockung von Zellen liegen, denn es wird überall da transkribiert, wo Zellen hin wandern oder hin verschoben werden müssen. In den Tentakel wandern lediglich aus aboraler Richtung Nematocyten und Epithelzellen als Batteriezellen ein (Hobmayer et al., 2012; laborinterne Beobachtungen), und in die Basalscheibe müssen Epithelzellen und schleimproduzierende Zellen einwandern (Campbell, 1967b). Da *fgf-c* sehr scharf und genau am Übergang z.B. zwischen auswachsenden Tentakel und Tentakelzone (Bode, 1996) transkribiert wird (Abb. 5.2 B.), spricht dies eher für ein Differenzierungs- als für ein Anlockungssignal. Beim Übergang von auswachsenden Tentakel

und Tentakelzone ist die letzte Zelle der Tentakelzone noch teilungsfähig und weist keine Differenzierungsmarker für Batteriezellen auf, während die direkte Nachbarzelle, die erste Tentakelzelle, sich nicht mehr teilen kann und spezifische Marker für Batteriezellen aufweist (Bode, 1996). Dies könnte dafür sprechen, dass FGF-c ein Differenzierungssignal vermittelt. Die Transkription oberhalb der Basalscheibe deutet ebenfalls eher auf ein solches Signal hin, denn auch hier ändern die Zellen ihre Morphologie (Hobmayer et al., 2012). Ebenso spricht auch die Transkription in den Testes für Differenzierung. Die Transkription befindet sich in dem Bereich, in dem die Spermatogenese stattfindet (Abb. 5.2 B). Kuznetsov et al. (2001) vermuten, dass die Epithelzellen einen spezifischen Faktor sezernieren, welchen die I-Zellen benötigen, um sich letztlich zu Spermien zu differenzieren. Dieser Faktor könnte FGF-c sein. Das Phänomen, dass Epithelzellen Proteine sekretieren, die dann wiederum Einfluss auf andere Zelltypen haben, konnten Takahashi et al. (2000) zeigen. Sie konnten zeigen, dass sogenannte PW-Peptide, die von ektodermalen Epithelzellen sekretiert werden die neuronale Differenzierung von I-Zellen inhibieren. Inwieweit die gesamte Spermatogenese von FGF/FGFR Signalweg abhängig ist, lässt sich im Rahmen dieser Arbeit nicht sagen.

5. 3. 2. 2 *fgf-c* Genregulation könnte indirekt über den WNT-Signalweg beeinflusst werden

Die Transkription von *fgf-c* unterhalb der Tentakelbasis deutete zunächst auf eine mögliche Beteiligung des WNT-Signalweg hin, denn an der Tentakelbasis wird *hvwnt8* transkribiert (Philipp et al., 2009). Die Annahme war daher, dass alle durch ALP erzeugten ektopischen Tentakel, die an der Basis *hvwnt8* aufweisen, auch *fgf-c* transkribieren. Die ISH zeigte, jedoch zum einen, dass nur eine geringe Zahl der ektopischen Tentakel *fgf-c* transkribiert, und zum anderen war die Transkription nicht immer unterhalb der Tentakelbasis, sondern auch links oder rechts an der Tentakelbasis oder fast um die gesamte Basis herum vorhanden. Die eigentlichen Kopftentakel wiesen gar keine Transkription mehr auf. Daher scheint es keine direkte Regulation über *HvWnt8* zu geben. Viel eher ist es eine indirekte Beeinflussung durch den WNT-Signalweg, denn ALP sorgt dafür, dass sich der Wirkungsbereich des Kopforgansators (u.a. *hvwnt3*) vergrößert bzw. dass neue ektopische Kopforgansatoren entstehen (Broun et al., 2005), wodurch es zu einer „Oralisierung“ des Gewebes kommt, bzw. das Gewebe/die Zellen ihre Positionsinformation verlieren und keine klare oral-aboral Achse mehr vorhanden ist. Das Fehlen einer eindeutigen oral-aboral Achse und der Verlust der Positionsinformation führen dann vermutlich zu einer veränderten *fgf-c* Transkription.

5. 3. 3. 1 FGF-e ist möglicherweise an der Knospenablösung beteiligt

Betrachtet man das Transkriptionsmuster von *fgf-e*, so gleicht es sehr der Transkription von *fgfr-a* während der Knospung (Abb. 5.2 B). Beide werden zunächst in der Spitze der Knospe, etwa bis Stadium 5/6, und ab Stadium 5 auch an der Knospenbasis transkribiert. Zudem verbleibt in beiden Fällen ein kleiner Ring von mRNA positiven Zellen nach Ablösen der Knospe im Elterntier. Sudhop et al. (2004) und Hasse et al. (2014) konnten zeigen, dass FGFRa essentiell für die Ablösung der Knospe ist. FGF-e könne also über FGFRa auch an der Knospenablösung beteiligt sein.

Die sehr ähnlichen Transkriptionsmuster von *fgf-e* und *fgfr-a* lassen vermuten, dass diese möglicherweise sogar in den gleichen Zellen transkribiert werden. Dies müsste man gegebenenfalls mit einer doppel-ISH überprüfen. Im Falle der Knospenablösung, die relativ schnell und auf einen kleinen Bereich beschränkt abläuft, würde es durchaus Sinn machen, Rezeptor und Ligand in der gleichen Zelle zu exprimieren. Denn so wäre die Wirkung des Liganden lokal sehr begrenzt und die Zellen könnten schnell reagieren.

5. 3. 3. 2 FGF-e spielt eventuell eine Rolle bei der Bildung von Körperöffnungen

Neben einer möglichen Beteiligung an der Knospung könnte FGF-e auch eine Rolle bei der Bildung der Körperöffnungen von *Hydra* spielen. Denn es wird zum einen während der Knospung, wenn sich die Mundöffnung bildet, transkribiert, und zum anderen auch apikal-distal im Bereich der Testes, in dem die Öffnung entsteht, über die die Spermien ins Wasser abgegeben werden (Abb. 5.2 B) (Nishimiya-Fujisawa und Kobayashi, 2012). Nachdem die Öffnung etabliert ist, wird die Transkription von *fgf-e* vermutlich wieder runter reguliert, denn die fertige Mundöffnung weist keine *fgf-e* Transkription mehr auf. Auch in der Basalscheibe befindet sich eine Öffnung, die sogenannte aborale Pore (Shimizu et al., 2007). Diese weist sowohl im adulten, als auch während der Bildung im Verlauf der Knospung keine *fgf-e* Transkription auf. Der Grund hierfür könnte die Art der Entstehung der Pore sein. Denn es wird keine Öffnung neu gebildet, sondern eine bereits vorhandene Öffnung verengt sich (Shimizu et al., 2007).

5. 3. 3. 3 *fgf-e* Transkription im Stiel gibt noch Rätsel auf

Die Transkription im Stiel, die zum Teil auch in die Knospungszone reicht, ist zurzeit nicht zu erklären. Im Bereich des Stiels könnte FGF-e für größere Zellabstände bzw. für die Umstrukturierung der Zellen sorgen. Die ektodermalen Epithelzellen sitzen hier anscheinend nicht so dicht wie in der Körpersäule. Denn im Stiel sind deutlich die Ganglienzellen sichtbar

(eigene Beobachtungen). Diese sind ansonsten, da sie an der Basis der Epithelzellen sitzen (Koizumi, 2002), innerhalb der Körpersäule meist nicht zu erkennen. Funktionell könnte FGF-e auch redundant zu FGF-a und/oder FGF-c sein; beide Gene werden ebenfalls im Stiel transkribiert (Abb. 5.2 B). Hinweise auf mögliche Funktionen sind nicht bekannt.

5. 3. 4. 1 FGF-f könnte in niedriger Konzentration als chemoattraktives Signal wirken, und in hoher Konzentration Zelladhäsion induzieren

FGF-f wird phylogenetisch den parakrinen FGFs und speziell der FGF Unterfamilie 8/17/18/24 zugeordnet. Zu dieser Eingruppierung passt, dass FGF-f ein Signalpeptid für die Sekretion besitzt, und auch tatsächlich sekretiert wird, was besonders gut während der Knospung zusehen ist. Die Eingruppierung in die Unterfamilie 8/17/18/24, und, dass das Protein sekretiert wird, lassen vermuten, dass es ähnliche Aufgaben wie die parakrinen FGFs erfüllt. Yang et al. (2002) konnten zeigen, dass parakrine FGFs positive und negative Chemotaxis vermitteln. Sie konnten nachweisen, dass während der Gastrulation beim Hühner Embryo FGF4 eine positive und FGF8 eine negative Chemotaxis vermittelt. McAvoy und Chamberlain (1989) konnten zeigen, dass FGFs abhängig von ihrer Konzentration Zellproliferation, Zellmigration und Zelldifferenzierung steuern. Diese Art der konzentrationsabhängigen Wirkungsweise nutzen auch Bae et al. (2012). Die Autoren entwickelten ein Modell zur Erklärung der mesodermalen Zellwanderung in *Drosophila*, in dem eine niedrige FGF-Konzentration die Zellmigration in Richtung FGF-Quelle fördert und eine hohe FGF-Konzentration die Zelladhäsion begünstigt. In einer adulten *Hydra* ist das Gewebe ständig in Bewegung, denn es werden immer neue Zellen gebildet und alte Zellen gehen verloren. Es bewegen sich konstant Zellen in orale und aborale Richtung, wobei aktiv kleine I-Zellen und ihre Derivate, wie Nematoblasten oder Nervenzellen, wandern. Diese Wanderung könnte möglicherweise durch FGF-f vermittelt werden. Denn in allen Bereichen, zu denen Zellen hin wandern, oder hin verschoben werden und an allen Termini, an denen Zellen abgegeben werden und somit neue Zellen nachfolgen müssen, wird *fgf-f* transkribiert (Abb. 5.2 B). Auch das Protein ist in all diesen Bereichen in sekretierter Form detektierbar. Die Anlockung könnte nach dem Modell von Bae et al. (2012) ablaufen. Das heißt FGF-f vermittelt in niedriger Konzentration eine positive Chemotaxis, so dass die Zellen in Richtung der Quelle wandern. Für die Funktion der Anlockung spricht auch die Transkription und Proteinlokalisierung während der Knospung, besonders bei der Entstehung der Tentakel, denn auch hier müssen Zellen hin verschoben werden, damit sich eine Tentakelknospe bilden kann. Die Transkription während der Entwicklung der Testes und auch das hauptsächlich apikal vorhandene Protein bei reifen Testes spricht ebenfalls für die Anlockung von Zellen, denn für die Bildung einer Testes müssen sich zunächst ektodermale Epithelzellen sammeln und anschließend I-Zellen

einwandern (Kuznetsov et al., 2001; Nishimiya-Fujisawa und Kobayashi, 2012). Letztendlich müssen die reifen Spermien zur apikalen Öffnung gelangen, um ins umgebende Medium zu gelangen. All diese Bewegungen könnten durch Anlockung über FGF-f induziert werden.

In hoher Protein-Konzentration könnte FGF-f Zelladhäsion und/oder Differenzierung induzieren. Für die Induktion der Ausbildung von Adhäsionsstrukturen sprechen die kleinen FGF-f positiven Bereiche in der Körpersäule von *Hydra*, in denen das Protein extrazellulär lokalisiert ist. Innerhalb dieser kleinen FGF-Quellen sind Nematoblasten bzw. Nematocyten zuerkennen. Es besteht also die Möglichkeit, dass das FGF-f Signal die Adhäsion zwischen den Zellen induziert und so die Nematoblastennester zusammen hält bzw. dafür sorgt, dass die Nematoblasten als Gruppe wandern (Campbell, 1974). Ein ähnliches Phänomen gibt es ebenfalls bei der Bildung des Seitenlinienorgans bei *Danio rerio*. Auch hier bilden sich kleine Bereiche, in denen FGF3 extrazellulär lokalisiert ist, die die Zellen zusammenhalten und diese bilden dann ein rosettenförmiges mechano-sensorisches Organ (Durdu et al., 2014). Ein Differenzierungssignal, was von FGF-f ausgeht, wäre im Falle dieser kleinen Bereiche in der Körpersäule auch möglich, denn die I-Zellen benötigen auch ein Signal, damit sie sich zu Nematoblasten differenzieren. Auch in den anderen Bereichen, in denen das FGF-f Protein in größer Menge vorhanden ist, wie z.B. an der Tentakelbasis, ist ein Signal zur Differenzierung der Epithelmuskelzellen in Batteriezellen nötig. Aufgrund der sehr spezifischen Transkription von *fgf-c* an dieser Stelle, ist das Signal der Differenzierung allerdings eher FGF-c zu zuschreiben (Abschnitt 5. 2. 2. 1).

5. 3. 4. 2 FGF-f könnte auch für die Etablierung von Grenzen und Morphogenese bei *Hydra* wichtig zu sein

Hydra besitzt verschiedene morphologisch sichtbare Grenzen (Abb. 5.2 A). Bis auf die Grenze zwischen Körpersäule und Stiel wird *fgf-f* an all diesen Grenzen transkribiert (Abb. 5.2 B) und ist auch als sekretiertes Protein vor Ort. Die Transkription und auch das Protein sind, meist noch bevor morphologisch eine Veränderung festzustellen ist, vorhanden. Dies lässt vermuten, dass FGF-f wichtig für die Etablierung von morphologischen Grenzen ist. Dass FGFs Grenzen etablieren, konnte für das parakrine FGF8 gezeigt werden. FGF8 ist mit für die Bildung der Grenze zwischen Mittel- und Hinterhirn bei Vertebraten (z.B. Huhn und Maus) verantwortlich (Echevarria et al., 2005).

FGF-f könnte möglicherweise nicht nur bei der Grenzbildung, sondern auch an der Morphogenese von *Hydra* beteiligt sein. FGF-f wird in allen Bereichen transkribiert, in denen eine Gestaltsänderung stattfindet, z.B. wenn sich Tentakel neu ausbilden (Abb. 5.2 B). Dies ist unabhängig davon, ob es während der Knospung, der Regeneration oder nach der Behandlung mit ALP stattfindet. An der Bildung einer Konstriktion scheint es aber nicht beteiligt

zu sein, denn sonst müsste es schon zu Beginn der Regeneration nach 2-4 h, wenn die Wundheilung abgeschlossen ist, transkribiert werden. Möglicherweise spielt es bei der Elongation von Knospe und Tentakel eine Rolle. Denn es wird sowohl während des Auswachsens der Tentakel, als auch während der Elongationsphase der Knospung transkribiert. Zudem scheint der Ablauf der Tentakel- und Knospenelongation ähnlich abzulaufen, denn das räumliche und zeitliche Transkriptionsmuster bei der Entstehung der ektopischen Tentakel ähnelt dem während der Knospung.

5. 3. 4. 3 *fgf-f* Transkriptionsvergleich zwischen *Hydra vulgaris* AEP und *Hydra vulgaris* Zürich spricht möglicherweise für eine konservierte Funktion von FGF-f

Sollte FGF-f essentielle Funktionen bei *Hydra* erfüllen, so sollte das Transkriptionsmuster auch bei anderen Arten/Linien identisch sein. Bis auf einen ektodermalen Ring oberhalb der Basalscheibe bei *Hydra vulgaris* Zürich, sind die Transkriptionsdomänen identisch. Dies spricht dafür, dass durchaus auch die Funktionen identisch sein können. Der Vergleich der beiden Transkriptionsmuster von *fgf-f* zwischen *Hydra vulgaris* AEP und *Hydra vulgaris* Zürich zeigt, etwas Überraschendes. Denn obwohl eine AEP-spezifische Sonde verwendet wurde und zwischen *Hydra vulgaris* AEP und *Hydra vulgaris* Zürich z.T. große Sequenzunterschiede herrschen (Martinez et al., 2010), ist die Transkription in *Hydra vulgaris* Zürich sehr viel stärker als in *Hydra vulgaris* AEP. Besonders gut sind bei *Hydra vulgaris* Zürich, im Gegensatz zu *Hydra vulgaris* AEP, die Transkriptionsdomänen an der Tentakelbasis und im Hypostom zu erkennen. Auch während der Knospung sind bei *Hydra vulgaris* Zürich schon im Stadium 2 *fgf-f* positive Zellen zu erkennen und auch in Stadium 8 ist der Ring an der Basis bereits geschlossen. Ob die unterschiedlich starke Transkription zwischen den Arten wirklich einen funktionellen Unterschied ausmacht, muss weiter untersucht werden.

5. 3. 4. 4 *fgf-f* könnte dem Anschein nach über den FGF/FGFR-Signalweg und/oder WNT-Signalweg reguliert werden

Bekannt ist, dass es innerhalb des FGF/FGFR-Signalwegs positive Rückkopplung gibt. Ohshiro et al. (2002) konnten zeigen, dass während der Tracheenentwicklung von *Drosophila melanogaster* *breathless* zu den Genen gehört, welches durch die Signalübertragung von Breathless (FGFR) und Branchless (FGF), aktiviert werden. Sie vermuten, dass so, durch Regulation über positive Rückkopplung, die Grundlage für eine kontinuierliche Rezeptorproduktion in den Tracheenzellen geschaffen wird. Eine ähnliche Art der Rückkopplung gibt es auch beim Auswachsen der Gliedmaßenknospe von Vertebraten. Hierbei induziert FGF10 aus dem Seitenplattenmesoderm die Transkription von FGF8 in der

apical ectodermal ridge (AER). Dieses FGF8 sorgt wiederum dafür, dass im Seitenplattenmesoderm FGF10 weiterhin synthetisiert wird (Martin, 1998). Für die Initiation der Gliedmaßenknospe konnte auch gezeigt werden, dass eine Signalübertragung durch den FGF/FGFR-Signalweg einen positiven Effekt auf die Transkription von FGFs hat, denn FGF8 aus dem intermediären Mesoderm induziert die Transkription von FGF10 im Seitenplattenmesoderm (Kawakami et al., 2001). Hierbei spielt auch der WNT-Signalweg eine Rolle (Kawakami et al., 2001; Martin, 2001).

Aufgrund dieser Tatsachen, dass zum einem die Transkription von FGFs über der FGF/FGFR-Signalweg gesteuert werden können und zum anderen auch der WNT-Signalweg die Transkription von FGF kodierenden Genen beeinflusst, wurde für *fgf-f* geschaut, ob die Transkription über FGFRa und/oder WNT reguliert wird.

Für die Untersuchung einer möglichen Regulierung über den FGF/FGFR-Signalweg, wurden SU5402 behandelte Tiere untersucht. SU5402 blockiert die Tyrosinkinase-Domäne von FGF-Rezeptoren und verhindert so die Signalweiterleitung in die Zelle. Sudhop et al., 2004 konnten zeigen, dass bei diesen Tieren keine oder nur eine fragmentierte Transkription von *fgfr-a* an der Knospenbasis vorhanden ist. Für *fgf-f*, das während der Knospung ebenfalls an der Knospenbasis transkribiert wird, zeigte sich das gleiche Ergebnis. Daher scheint die Transkription von *fgf-f* an der Basis der Knospe über den FGFRa-Signalweg reguliert zu werden. Die anderen Transkriptionsdomänen, z.B. in der Basalscheibe und Tentakelspitze, scheinen über andere Wege reguliert zu werden, denn sie waren von der SU5402 Behandlung nicht betroffen.

Ob eine direkte oder indirekte Regulation über den WNT-Signalweg stattfindet, wurde mittels ALP Behandlung untersucht. ALP überaktiviert den WNT-Signalweg und sorgt so für die Entstehung ektopischer Tentakel (Philipp et al., 2009). Diese transkribieren, wie die Kopftentakel *hvwnt5* in der Tentakelspitze und *hvwnt8* an der Tentakelbasis (Philipp et al., 2009). Betrachtet man die Transkription von *fgf-f* bei den ektopischen Tentakeln, so wird in allen Spitzen *fgf-f* transkribiert. Das könnte ein Indiz dafür sein, dass die Transkription von *fgf-f* in der Tentakelspitze über HwWnt5 reguliert wird. An der Basis wird *fgf-f* nur zu Beginn, wenn sich Tentakelknospen bilden, transkribiert. Dies ist ein mögliches Indiz für die Regulation über HwWnt8. Dass bei ausgewachsenen Tentakeln keine *fgf-f* Transkription mehr zu sehen ist, könnte daran liegen, dass die ISH als Methode nicht ausreicht, denn auch bei den Kopftentakeln ist die Transkription nur sehr schwach.

fgf-f könnte also abhängig von Ort der Transkription sowohl über den FGF/FGFR-Signalweg, als auch über den WNT-Signalweg reguliert werden.

5. 3. 5 Die FGFR Proteinlokalisierung spricht für Beteiligung an der Knospenablösung und eine mögliche Interaktion mit FGF-f

5. 3. 5. 1 Die Lokalisation des FGFR Proteins an der Knospenbasis untermauert die Aussage: FGFRa ist essentiell für die Knospenablösung

Inhibitionsversuche mit SU5402 und auch die ektopische Transkription von FGFRa (*full length* und trunkiert) haben gezeigt, dass FGFRa essentiell für die Knospenablösung ist, während die Entstehung und das Auswachsen der Knospen nicht beeinflusst wurde (Sudhop et al., 2004; Hasse et al., 2014). Dies steht nicht ganz im Einklang mit dem Transkriptionsmuster von *fgfr-a* während der Knospung, denn die Transkription ist während der gesamten Knospung zu beobachten. Betrachtet man aber die Lokalisation des Proteins, wobei nicht zwischen FGFR a und b zu unterscheiden ist, so wird dennoch deutlich, dass das Protein wahrscheinlich erst während der Ablösungsphase der Knospung an der Knospenbasis vorhanden ist, denn in Stadium 6 findet sich kein Protein an der Basis der Knospe. Dies lässt zwei Möglichkeiten zu. Erstens, wird bis inklusive Stadium 6 kein Protein synthetisiert. Oder zweitens, das Protein wird zwar synthetisiert, ist aber nicht stabil und wird sehr schnell wieder abgebaut und könnte daher immunhistochemisch nicht nachweisbar sein. Der erste Fall, dass zunächst viel RNA und wenig Protein und später wenig RNA und viel Protein vorhanden ist, konnte bei Embryonen von *C. elegans* gezeigt werden. Hier ist in Embryonen mit viel mRNA für PKC1B (neuronal Proteinkinase C) wenig PKC1B Protein vorhanden (Land et al., 1994). Für den zweiten Fall, dass das Protein vorhanden, aber nicht stabil ist, scheint am wahrscheinlichsten zu sein, denn die sensitivste Phase für SU5402 schon in Knospenstadium 3 ist. Das Protein muss also vorhanden sein, ansonsten hätte die Behandlung mit SU5402 bei Knospen in Stadium 3 keinen Effekt.

Das Fehlen der mRNA von *fgfra* nach einer Behandlung mit SU5402 könnte eventuell für eine positive Rückkopplung, ähnlich wie bei Breathless (Ohshiro et al., 2002), sprechen. Sodass *fgfra* und auch vielleicht *fgfrb* neben *fgf-f* auch zu den Zielgenen der Signalweiterleitung über FGFRa gehören.

5. 3. 5. 2 Die Lokalisation der Proteine von FGF-f und FGFR deutet auf eine mögliche Interaktion zwischen beiden hin

Ein erstes Indiz dafür, dass FGF-f und FGFR mit einander interagieren können, ist die Lokalisation beider Proteine an einigen Zellen der Basalscheibe. In beiden Fällen, sowohl bei IHC gegen FGF-f als auch FGFR, sind Zellen der Basalscheibe positiv für FGF-f und FGFR. Einen zweiten Hinweis für eine Interaktion liefert die Lokalisation beider Proteine in

Batteriezellen der Tentakelspitze und auch in Batteriezellen entlang der Tentakel. Auch die Lokalisation beider Proteine bei späten Knospenstadien könnte für eine Interaktion von FGF-f und FGFR sprechen, wobei hier auch FGF-e als Interaktionspartner nicht auszuschließen ist, da auch in späten Knospenstadien das Transkript von *fgf-e* vorhanden ist. Ob FGF-e als Interaktionspartner eine Rolle spielt, könnte ein Peptid-AK gegen FGF-e zeigen.

Einen weiteren Hinweis für die Bindung von FGF-f an FGFR, liefern die Ganglienzellen im Stiel von *Hydra*. Sie sind sowohl FGF-f als auch FGFR positiv. Da FGF-f nicht in Neuronen transkribiert wird, dies zeigte die Mazerat-IHC (hier finden sich keine FGF-f positiven Neurone), ist es vermutlich über einen der FGFRs an die Membran der Ganglienzellen gebunden.

Die Lokalisation von FGF-f in Neuronen erschien zuerst ungewöhnlich, weil das Transkriptionsmuster diesbezüglich keinen Hinweis lieferte. Doch bei genauerer Betrachtung zeigte sich, dass auch diese Lokalisation von FGF-f in den Ganglienzellen zu der Annahme passt, dass FGF-f ein Signal zur Zellanlockung darstellt. Denn auch Nervenzellen müssen in der Körpersäule wandern, da auch sie an den Körperenden verloren gehen oder in die Knospe verschoben werden (Koizumi, 2002). Genaueren Aufschluss darüber, ob FGF-f an FGFRa oder b bindet, könnte zum einen eine Doppelmarkierung der Proteine in einem Tier und zum anderen eine Immunopräzipitation liefern. Um allerdings FGFRa und FGFRb unterscheiden zu können, müssten neue Antikörper designet werden, da das Epitop des aktuellen Antikörpers sowohl in FGFRa, als auch in FGFRb vorhanden ist.

5. 3. 6 Die Rezeptoren FGFRb und HvFGFRL1 deuten auf komplexe Funktionen und Regulation des FGF/FGFR-Signalwegs hin

5. 3. 6. 1 FGFRb ist möglicherweise auch an der Knospenablösung beteiligt

fgfr-b wird in den späten Stadien (ab Stadium 5) der Knospung identisch mit *fgfr-a* transkribiert. Für FGFRa konnte gezeigt werden, dass er für die Ablösung der Knospe nötig ist (Hasse et al., 2014). FGFRa aktiviert hierbei den MAP-Kinase-Signalweg, über den dpERK in den Kern gelangt und für die Knospenablösung relevante Gene transkribiert. Zudem scheint FGFRa über Rho auf die Anordnung des Zytoskeletts Auswirkungen zu haben (Hasse et al., 2014). Die hohe Sequenzidentität vermuten lässt, dass FGFRb redundant zu FGFRa ist. Denkbar ist aber auch, dass beide Rezeptoren synergetisch zusammenarbeiten müssen, damit es zur Ablösung der Knospung kommt.

5. 3. 6. 2. 1 HvFGFRL1 agiert möglicherweise als Negativ-Regulator für den FGF/FGFR Signalweg

Seit seiner Entdeckung 2000 wird FGFRL1 aufgrund einer intrazellulär fehlenden Tyrosinkinase-Domäne als ein möglicher negativer Regulator für den FGF/FGFR-Signalweg angesehen (Trüb, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass er in der Lage ist FGFs zu binden (Steinberg et al., 2010), und dass die intrazelluläre Domäne, im Gegensatz zur extrazellulären Domäne, keine lebenserhaltende Funktion hat (Bluteau et al., 2014). Betrachtet man die Sequenz des HvFGFRL1, so besteht auch hier die Möglichkeit, dass er als negativer Regulator für den FGF/FGFR Signalweg fungiert. Die Sequenz zeigt, dass zum einen ein Signalpeptid zur Sekretion vorhanden ist und zum anderen auch drei Ig-ähnliche Schleifen. Wie die FGFRL1 Rezeptoren der Bilateria besitzt HvFGFRL1 die für die FGF-Bindung wichtige Ig-ähnliche Schleife drei. Der größte Unterschied zu den FGFRL1 Rezeptoren der Vertebraten und Invertebraten besteht im Fehlen der Transmembran- und der intrazellulären Domäne. Normalerweise ist FGFRL1 auch in der Membran verankert und besitzt bei Vertebraten intrazellulär meist eine Histidin reiche Region (Zhuang et al., 2015). Er kann allerdings auch von der Zelloberfläche abgeschnitten werden und in den interstitiellen Raum diffundieren (Steinberg et al., 2010). Johnson et al. fanden 1990 alternative Spleiß-Varianten von FGFR1, die ebenfalls nur aus Ig-ähnlichen Schleifen bestehen. Es ist also möglich das HvFGFRL1 weder eine Transmembran- noch eine intrazelluläre Domäne besitzt.

Für *Hydra* würde dies also bedeuten, dass HvFGFRL1 sekretiert wird und nicht membran-gebunden ist, und möglicherweise aufgrund seiner Affinität zu HSPG nur eine geringe Diffusionsreichweite hat und damit sehr lokal agiert. Zudem bringt er alle Voraussetzungen mit FGFs zu binden und somit den FGF/FGFR-Signalweg negativ zu regulieren. Einen möglichen Aufschluss über die Funktionen könnten entweder transgene Tiere, die z.B. HvFGFRL1 überexprimieren oder *knockouts* mit *Antisense*-Oligonukleotiden liefern.

5. 3. 6. 2. 2 HvFGFRL1 nimmt möglicherweise Einfluss auf die Zellwanderung und reguliert die Anzahl der Tentakel

Unterhalb der Tentakel und der Tentakelzone findet sich bei *Hydra* ein sogenannter stationärer Bereich, in dem kaum oder nur langsam Zellwanderung ins Hypostom stattfindet (Campbell, 1967b; Aufschnaiter et al., 2011). Die Zellen wandern hier nur sehr langsam in Richtung Hypostom und es gibt keine Zellwanderung vom Hypostom in Richtung aborales Ende (Campbell, 1967b; Hobmayer et al., 2012). HvFGFRL1, der sowohl zwischen, als auch oberhalb der Tentakel transkribiert wird, könnte hierbei eine Rolle spielen. Strukturell weist der Rezeptor die gleichen Merkmale, die für die Bindung von FGFs nötig sind, auf, wie zum

Beispiel FGFR1 der Vertebraten. Das heißt er müsste in der Lage sein FGFs zu binden. Somit bestünde die Möglichkeit, dass HvFGFR1 das Locksignal, welches möglicherweise von FGF-f in der Hypostomspitze ausgeht, soweit reduziert, dass nur noch wenig FGF-f vorhanden ist. Die Zellen wandern nun, aufgrund eines fehlenden oder nur in großen zeitlichen Abständen auftretenden Signals, sehr langsam. Zudem wäre so auch eine Rückwanderung der Zellen, von oral nach aboral verhindert. Denn HvFGFR1 würde auch das FGF-f, das von der Tentakelbasis aus sekretiert wird, wegfangen. In diesem Fall hätte er eine Art Barrierefunktion.

Eine weitere Funktion könnte die Regulierung der Anzahl der Tentakel sein. Die Tentakel von *Hydra* befinden sich in einem Kranz unterhalb des Hypostoms. Dabei stehen sie in einem gleichmäßigen Abstand zueinander (Bode und Bode, 1987). Für die Einhaltung des Abstands könnte HvFGFR1 verantwortlich sein, denn er wird zwischen den Tentakeln transkribiert. Zudem wird HvFGFR1 während der Knospung und der Kopfregeneration, sobald sich Tentakel anfangen auszubilden, komplementär zu *fgf-f* transkribiert. Das würde bedeuten, HvFGFR1 bindet FGF-f und würde so die Reichweite von FGF-f stark beschränken, so dass die Tentakel in nur lokal, mit einem gewissen Abstand zueinander gebildet werden und nicht direkt aneinander. Auch die Ergebnisse der ALP Behandlung lassen dies zum Teil vermuten, da in Bereichen, in denen keine ektopischen Tentakel ausgewachsen sind, *hvfgr1* transkribiert wird. Die komplementäre Transkription von *fgf-f* und *hvfgr1*, nach dem beide zu Beginn der Knospung großflächig transkribiert wurden, erinnert an die Ausbildung des Neuroektoderms bei *D. melanogaster* mittels lateraler Inhibition über das Delta-Notch-System (Campos-Ortega und Kunst, 1990; Ehebauer et al., 2006). Möglicherweise wird bei *Hydra* die Lage der Tentakel zueinander bzw. wo ein Tentakel auswächst, auch über eine Art laterale Inhibition reguliert, die Einfluss auf die Transkription von *fgf-f* und/oder *hvfgr1* hat.

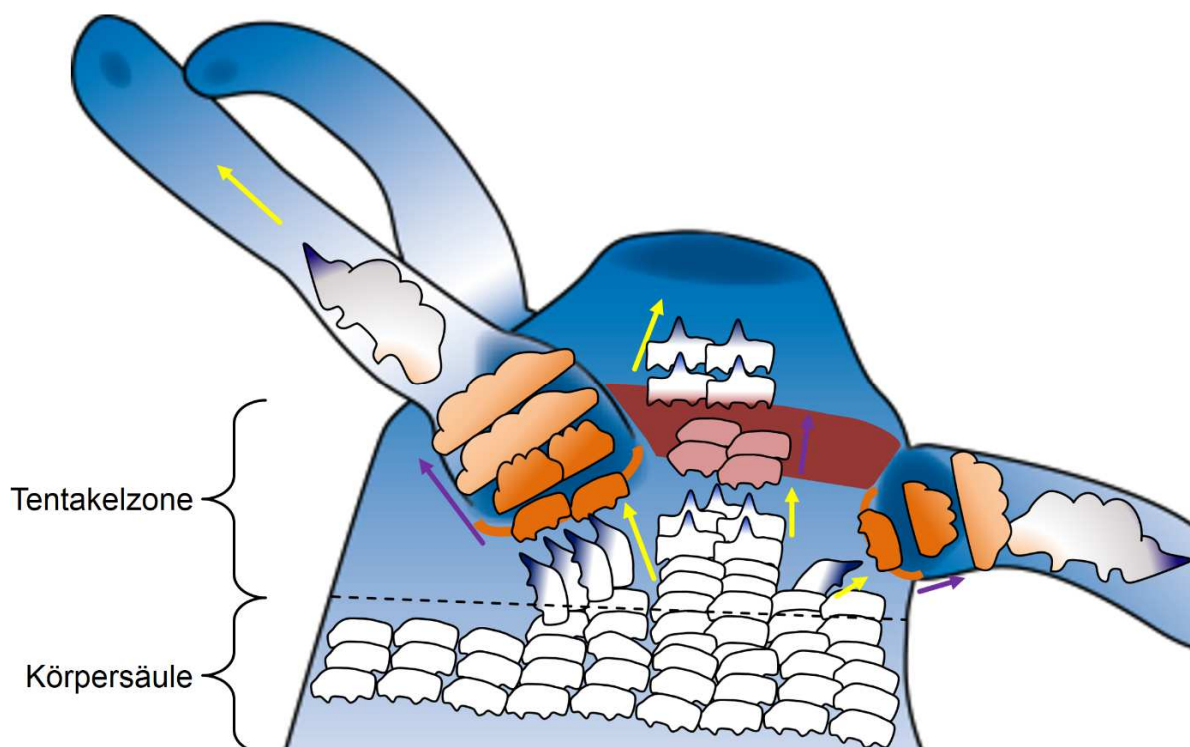
5. 4 Modelle zu möglichen Funktionen der *Hydra* FGFs und der *Hydra* FGF-Rezeptoren

Obwohl für die FGFs von *Hydra vulgaris* AEP momentan nur Transkriptionsmuster und nur für FGF-f Daten über die Lokalisation des Proteins vorhanden sind, sollen nachfolgend drei Modelle zur Funktion der FGFs unter Beteiligung der FGF-Rezeptoren vorgeschlagen werden. Diese sollen für die Zukunft Anhaltspunkte liefern, in welche Richtung nachfolgende Versuche gehen könnten.

5. 4. 1 Modell zur Funktion von FGF-c, FGF-f und HvFGFRL1 während der Entstehung von Batteriezellen und der Wanderung von ektodermalen Epithelzellen ins Hypostom

Ausgehend von der Annahme, dass FGF-f als chemoattraktives Signal fungiert, FGF-c ein Differenzierungssignal vermittelt und HvFGFRL1 tatsächlich ein negativer Regulator des FGF/FGFR-Signalwegs ist, wird folgendes Modell vorgeschlagen: Zunächst bewegen sich die ektodermalen Epithelzellen als gesamtes Gewebeblatt in Richtung Tentakelzone (Abb. 5.3). In der Tentakelzone angekommen, werden die Zellen aufgrund des chemoattraktiven Signals von FGF-f zur Basis der Tentakel „gelockt“ (Abb. 5.3). An der Basis der Tentakel erhalten sie durch FGF-c das Signal sich zu Batteriezellen zu differenzieren (Abb. 5.3). Anschließend werden die sich jetzt zu Batteriezellen differenzierten Zellen, durch das Ankommen neuer Zellen, passiv über die FGF-f Quelle an der Basis hinaus verschoben und wandern dann aktiv durch das FGF-f vermittelte „Locksignal“ bis in die Tentakelspitze (Abb. 5.3).

Von den in der Tentakelzone ankommenden Zellen werden jedoch nicht alle Zellen zur Tentakelbasis verschoben, einige wandern auch in das Hypostom. Diese Zellen wandern jedoch erheblich langsamer, was an HvFGFRL1 liegen könnte. Die Zellen wandern vermutlich langsamer, weil HvFGFRL1 das FGF-f, welches aus den Hypostom kommt, abfängt und so das chemoattraktive Signal zum Anlocken der Zellen fehlt oder allenfalls nur sehr schwach ist (Abb. 5.3). Die Zellen werden daher möglicherweise durch nachfolgende Zellen passiv weiter geschoben. Nachdem sie den Bereich der Wirkung von HvFGFRL1 verlassen haben, wandern sie wieder aktiv, aufgrund der Anlockung durch FGF-f ins Hypostom (Abb. 5.3).



▲ Abbildung 5.3. Modell zur Funktion von FGF-c, FGF-f und HvFGFRL1 bei *Hydra vulgaris* AEP am Beispiel von ektodermalen Epithelzellen.

dunkelblau: FGF-f Quellen; blau: FGF-f Proteingradient; orange Halbkreise: FGF-c Lokalisation; rot: HvFGFRL1 Lokalisation; gelbe Pfeile: aktive Wanderung in Pfeilrichtung; lila Pfeile: passive Verschieben in Pfeilrichtung verschoben; weiße Zellen: ektodermale Epithelzellen, der Körpersäule; kleine Zellen mit blauen Spitzen: ektodermale Epithelzellen, die auf FGF-f reagieren; dunkelorange/orange Zellen: ektodermale Epithelzellen, die auf FGF-c reagierten und sich zu Batteriezellen differenzieren; hellorange Zellen: ausdifferenzierte Batteriezellen; große Zellen mit blauen Spitzen: Batteriezellen, die auf FGF-f reagieren; dunkelrosa Zellen: ektodermale Epithelzellen, die aufgrund des fehlenden Signals von FGF-f, durch HvFGFRL1, nicht aktiv ins Hypostom wandern; Zellen mit blauen und rosa Spitzen: ektodermale Epithelzellen, die den Wirkungsbereich von HvFGFRL1 verlassen haben und wieder auf FGF-f reagieren; gestrichelte Linie: Grenze zwischen Körpersäule und Tentakelzone.

[Größenverhältnisse nicht maßstabsgetreu]

5. 4. 2 Modell zur Funktion von FGF-f während der Wanderung von Nematoblasten

Basierend auf dem Modell von Bae et al. (2012), in dem FGFs in niedriger Konzentration Zellwanderung in Richtung FGF-Quelle auslösen und bei hoher Konzentration Zelladhäsion vermitteln, wurde das nachfolgende Modell entwickelt. Im diesem wird davon ausgegangen, dass FGF-f in geringer Konzentration Zellwanderung und in hoher Konzentration Zelladhäsion vermittelt.

In *Hydra* treten Nematoblasten immer in kleinen Gruppen, bestehend aus 4, 8, 16 oder ein Vielfaches davon auf. Sie wandern aktiv in diesen Gruppen entlang der Körpersäule (Campbell, 1974). Die in der Körpersäule vorkommenden Nematoblastennester sind von FGF-f umschlossen (FGF-f ist extrazellulär vorhanden) (Abb. 5.4). Diese hohe Konzentration an FGF-f induziert möglicherweise die Ausbildung von Adhäsionsstrukturen zwischen den Zellen und sorgt dafür, dass die Zellen in dieser Gruppe verbleiben. Entferntere FGF-f Quellen bzw. die FGF-f Quellen z.B. an der Tentakelbasis locken dann diese zusammenhängenden Zellen an (Abb. 5.4). Ähnlich ist dies beim Auswachsen des Tracheensystems von *Drosophila melanogaster* oder der Ausbildung des Gefäßsystems bei Vertebraten, auch hier befindet sich eine Zelle an der Spitze einer Zellgruppe, die die anderen Zellen „mitzieht“ (Affolter et al., 2009). An der Tentakelbasis könnte FGF-f aufgrund der sehr hohen Konzentration die Adhäsion, von jetzt, reifen Nematocyten und den Batteriezellen induzieren. Nematocyten, die in keiner Zelle an der Basis Platz finden, könnten durch die FGF-f Quelle in der Tentakelspitze angelockt werden und sich dann in leere Batteriezellen entlang des Tentakels setzen (Abb. 5.4).

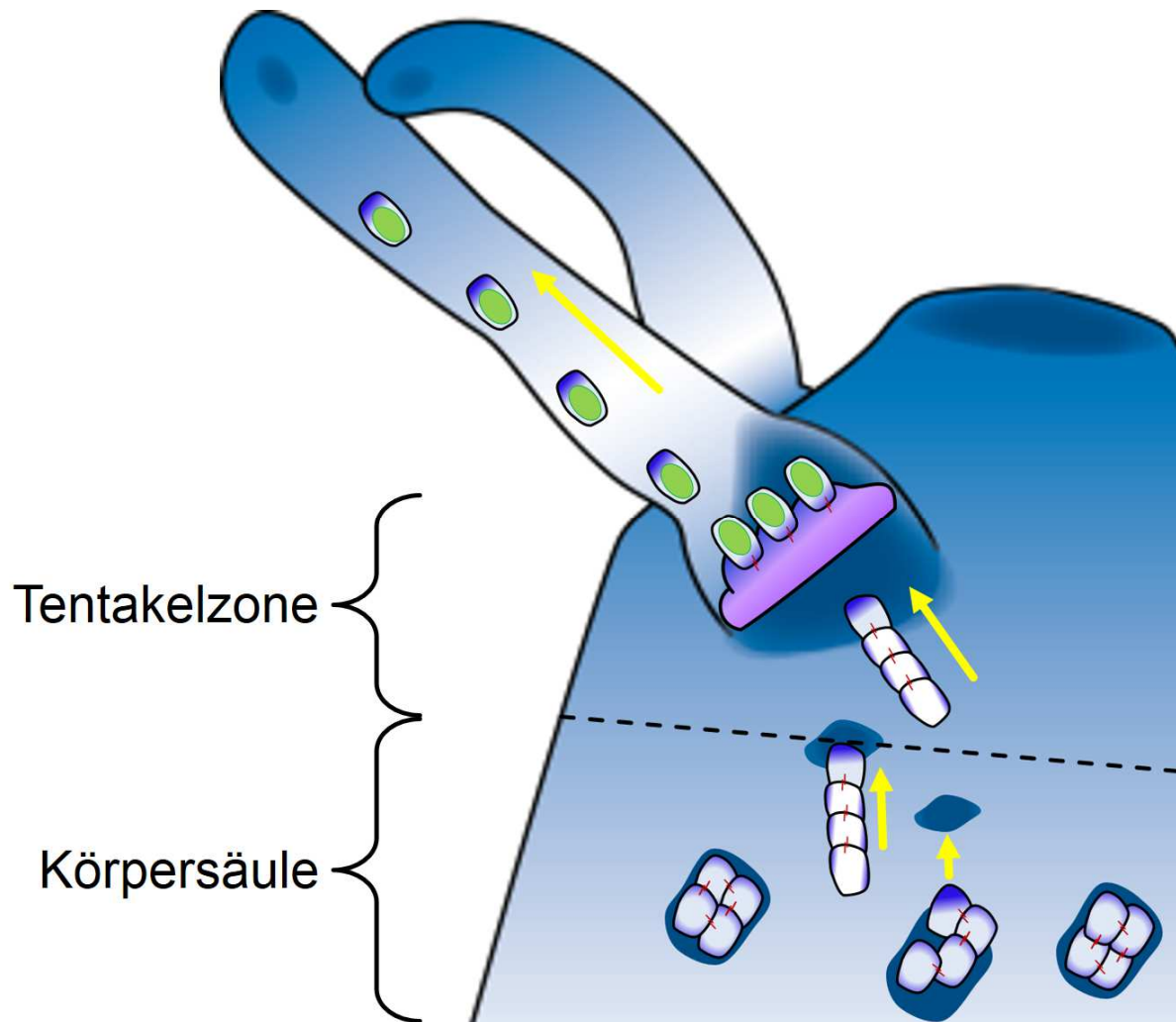


Abbildung 5.4: Modell zur Funktion von FGF-f bei der Wanderung von Nematoblasten in *Hydra vulgaris* AEP.

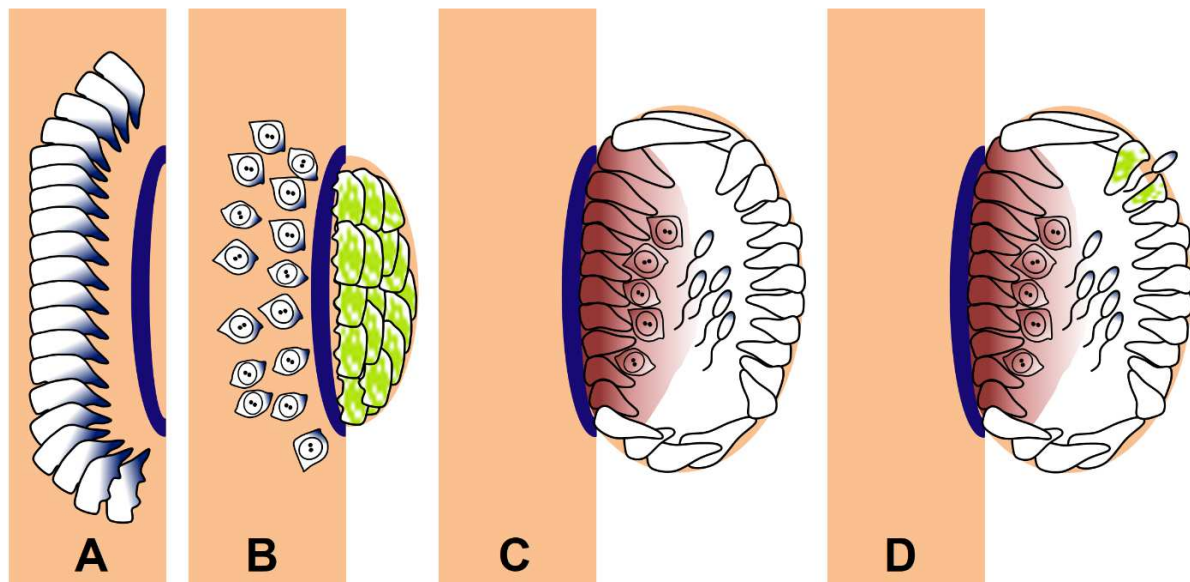
dunkelblau: FGF-f Quellen; blau: FGF-f Proteingradient; gelbe Pfeile aktive Wanderung in Pfeilrichtung; rote Linien: durch FGF-f vermittelte Zelladhäsion; grüne Ovale: Nematocysten; Zellen mit blassblauen Bereichen: Nematocyten, die auf FGF-f reagieren und Zell-Zellkontakte ausbilden; Zellen mit dunkelblauen Bereichen: Nematoblasten, die auf FGF-f reagieren und aktiv wandern; blasslila: Batteriezele; gestrichelte Linie: Grenze zwischen Körpersäule und Tentakelzone.

[Größenverhältnisse nicht maßstabsgetreu]

5. 4. 3 Modell zur Funktion von FGF-c, FGF-e und FGF-f während der Entstehung der Testes und Spermatogenese

Für das Modell zur Entstehung der Testes und der darin stattfindenden Spermatogenese wird für FGF-f erneut angenommen, dass es ein chemoattraktives Signal und z.T. Zelladhäsion vermittelt. Bei FGF-c wird davon ausgegangen, dass durch die Bindung von FGF-c an einen FGFR, wie beim Modell zur Entstehung der Batteriezellen, Gene für die Differenzierung angeschaltet werden. Für FGF-e wird angenommen, dass ein Signal zur Umstrukturierung bzw. zur Auftrennung von Zell-Zellkontakten vermittelt wird.

Während der Bildung der Testes ist als erstes FGF-f „aktiv“ und sorgt dafür, dass sich ektodermale Epithelzellen akkumulieren und zusammen gehalten werden (Abb. 5.5 A, B). Unmittelbar danach vermittelt FGF-e das Signal zur Umstrukturierung und es bildet sich innerhalb der Ansammlung von ektodermalen Epithelzellen ein Lumen (Abb. 5.5 B, C). Durch das weiterhin vorhandene Signal von FGF-f bleiben die Zellen dennoch in Kontakt. In dem entstanden Lumen sammeln sich anschließend die über FGF-f angelockten I-Zellen (Abb. 5.5 B, C). Diese erhalten dann über FGF-c das Differenzierungssignal zur Umwandlung in Stammzellen der männlichen Keimbahn, aus denen dann Spermien entstehen (Abb. 5.5 C). Währenddessen vermittelt FGF-e an der Spitze der Testes erneut ein Signal zur Umstrukturierung bzw. zum Lösen von Zell-Zellkontakten an die Epithelzellen, sodass sich eine Pore bildet, über die die Spermien ins Wasser gelangen können (Abb. 5.5 D). Die Migration der Spermien zu dieser Pore wird dabei wieder von FGF-f bewirkt (im Modell nicht gezeigt).



▲ **Abbildung 5.5: Model zur Funktion von FGF-c, FGF-e und FGF-f während der Ausbildung einer Testes und der Spermatogenese bei *Hydra vulgaris* AEP.**

(A) Anlockung von ektodermalen Epithelzellen (blau-weiße Zellen), durch FGF-f (blauer Halbkreis), orange: Körpersäule von *Hydra*. (B) Anlockung von I-Zellen (blau-weiße Zelle), durch FGF-f (blauer Halbkreis) und Ausbildung einer Testesknospe. grün: FGF-e Signal zur Lumenbildung, (C) I-Zellen (rötliche Zellen) differenzieren sich zu reifen Spermien (blau-weiße Zellen mit Geißel). Rot: FGF-c vermittelt Differenzierungssignal. (D) Pore zur Abgabe der Spermien entsteht durch FGF-e vermitteltes Signal, grün: FGF-e.

[Größenverhältnisse nicht maßstabsgetreu]

5. 5 Fazit

Trotz der Einfachheit von *Hydra* ist der FGF/FGFR Signalweg ähnlich komplex wie beispielsweise bei Vertebraten. Im Falle von *Hydra vulgaris* AEP gibt es mindestens 6 FGFs: FGF-a, FGF-b, FGF-c, FGF-e, FGF-f und HvFGF1/2. Ihnen gegenüber stehen zwei kanonische Rezeptoren FGFRa und FGFRb und ein nicht-kanonischer Rezeptor HvFGFRL1. Die Transkriptionsmuster der FGFs und der FGF-Rezeptoren, sowie die Proteinverteilung von FGF-f und FGFR deuten darauf hin, dass der FGF/FGFR-Signalweg in *Hydra* ähnlich komplexe Funktionen wie bei Vertebraten aufweist und ebenfalls bei der Zellmigration und Zelldifferenzierung eine Rolle spielt.

5.6 Ausblick

Die hier festgestellten Verteilungen der Transkripte der FGFs und FGFRs weisen auf eine komplexe Rolle des FGF/FGFR Signalweges für verschiedene morphogenetische Veränderungen von *Hydra* hin. Die hier aufgestellten Hypothesen sollten in Zukunft getestet werden. Auch für die FGFs FGF-a bis FGF-e müsste geschaut werden, wo im Tier die Proteine lokalisiert sind, ob sie sekretiert werden bzw. in welchen Zelltypen sie exprimiert werden. Auch für FGFRa und b müssen neue AK designt werden, da es im Moment so aussieht, dass das eigentlich FGFRa-spezifische Epitop auch in FGFRb vorhanden ist. Für die gefundenen Liganden muss festgestellt werden, ob sie spezifisch an einen der beiden Rezeptoren binden. Hierzu fehlen Interaktionsstudien, zum Beispiel mittels Ko-Immunpräzipitation oder durch einen Hefe-2-Hybrid Assay (Fields und Song, 1989). Hierbei müsste allerdings berücksichtigt werden, dass eine der beiden Komponenten löslich, also nicht in der Membran gebunden, ist. Es könnte so schon durch räumliche Nähe der von z.B. FGFRa und FGF-f zu einem Falsch-positiven Signal im Assay kommen. Möglicherweise lassen sich auch durch transgene Tiere, die z.B. ein FGF überexprimieren oder auch ektopisch exprimieren, oder durch gezielten *knockouts* eines FGFs oder FGF-Rezeptors mittels Antisense-Oligonukleotiden eindeutige Aussagen über die Funktion der einzelnen FGFs und FGF-Rezeptoren treffen. Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der individuellen FGF Funktionen wären auch die Injektion der Proteine in die Tiere, um zu sehen, ob möglicherweise Zellen angelockt werden oder normalerweise nicht auftretende Differenzierung stattfindet. Hierbei wäre das Einbringen der Proteine über eine Kanüle, mittels *gene gun* (Sanford et al., 1987) oder durch Elektroporation möglich.

6 Literaturverzeichnis

Adler PN (2002) Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell* 2(5):525–535

Affolter M, Zeller R, Caussinus E (2009) Tissue remodelling through branching morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(12):831–842. doi: 10.1038/nrm2797

Alexandrova O, Schade M, Böttger A, David CN (2005) Oogenesis in *Hydra*: nurse cells transfer cytoplasm directly to the growing oocyte. *Dev Biol* 281(1):91–101. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.02.015

Amann R, Trueb B (2013) Evidence that the novel receptor FGFR1 signals indirectly via FGFR1. *Int J Mol Med* 32(5):983–988. doi: 10.3892/ijmm.2013.1484

Amann R, Wyder S, Slavotinek AM, Trueb B (2014) The FgfrL1 receptor is required for development of slow muscle fibers. *Dev Biol* 394(2):228–241. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.08.016

Amaya E, Stein PA, Musci TJ, Kirschner MW (1993) FGF signalling in the early specification of mesoderm in *Xenopus*. *Development* 118(2):477–487

Antoine M, Reimers K, Dickson C, Kiefer P (1997) Fibroblast growth factor 3, a protein with dual subcellular localization, is targeted to the nucleus and nucleolus by the concerted action of two nuclear localization signals and a nucleolar retention signal. *J Biol Chem* 272(47):29475–29481

Anton-Erxleben F, Thomas A, Wittlieb J, Fraune S, Bosch TCG (2009) Plasticity of epithelial cell shape in response to upstream signals: a whole-organism study using transgenic *Hydra*. *Zoology (Jena)* 112(3):185–194. doi: 10.1016/j.zool.2008.09.002

Atsuta Y, Takahashi Y (2015) FGF8 coordinates tissue elongation and cell epithelialization during early kidney tubulogenesis. *Development* 142(13):2329–2337. doi: 10.1242/dev.122408

- Aufschnaiter R, Zamir EA, Little CD, Özbek S, Munder S, David CN, Li L, Sarras MP, Zhang X (2011) In vivo imaging of basement membrane movement: ECM patterning shapes Hydra polyps. *J Cell Sci* 124(Pt 23):4027–4038. doi: 10.1242/jcs.087239
- Bae Y, Trisnadi N, Kadam S, Stathopoulos A (2012) The role of FGF signaling in guiding coordinate movement of cell groups: guidance cue and cell adhesion regulator? *Cell Adh Migr* 6(5):397–403. doi: 10.4161/cam.21103
- Baertschi S, Zhuang L, Trueb B (2007) Mice with a targeted disruption of the *Fgfr1* gene die at birth due to alterations in the diaphragm. *FEBS J* 274(23):6241–6253. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06143.x
- Beenken A, Mohammadi M (2009) The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8(3):235–253. doi: 10.1038/nrd2792
- Beenken A, Mohammadi M (2012) The structural biology of the FGF19 subfamily. *Adv Exp Med Biol* 728:1–24. doi: 10.1007/978-1-4614-0887-1_1
- Beermann A, Schröder R (2008) Sites of Fgf signalling and perception during embryogenesis of the beetle *Tribolium castaneum*. *Dev Genes Evol* 218(3-4):153–167. doi: 10.1007/s00427-007-0192-x
- Bertrand S, Somorjai I, Garcia-Fernandez J, Lamonerie T, Escriva H (2009) FGFR1 is a neglected putative actor of the FGF signalling pathway present in all major metazoan phyla. *BMC Evol Biol* 9:226. doi: 10.1186/1471-2148-9-226
- Bertrand S, Iwema T, Escriva H (2014) FGF signaling emerged concomitantly with the origin of Eumetazoans. *Mol Biol Evol* 31(2):310–318. doi: 10.1093/molbev/mst222
- Bluteau G, Zhuang L, Amann R, Trueb B (2014) Targeted disruption of the intracellular domain of receptor *Fgfr1* in mice. *PLoS ONE* 9(8):e105210. doi: 10.1371/journal.pone.0105210
- Bode HR (1996) The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *J Cell Sci* 109 (Pt 6):1155–1164

- Bode PM, Bode HR (1987) Formation of pattern in regenerating tissue pieces of *Hydra attenuata*. IV. Three processes combine to determine the number of tentacles. *Development* 99(1):89–98
- Boehm A, Bosch TCG (2012) Migration of multipotent interstitial stem cells in *Hydra*. *Zoology (Jena)* 115(5):275–282. doi: 10.1016/j.zool.2012.03.004
- Böttger A, Hassel M (2012) *Hydra*, a model system to trace the emergence of boundaries in developing eumetazoans. *Int J Dev Biol* 56(6-8):583–591. doi: 10.1387/ijdb.113454ab
- Bouleau S, Grimal H, Rincheval V, Godefroy N, Mignotte B, Vayssière J, Renaud F (2005) FGF1 inhibits p53-dependent apoptosis and cell cycle arrest via an intracrine pathway. *Oncogene* 24(53):7839–7849. doi: 10.1038/sj.onc.1208932
- Broun M, Bode HR (2002) Characterization of the head organizer in *hydra*. *Development* 129(4):875–884
- Broun M, Gee L, Reinhardt B, Bode HR (2005) Formation of the head organizer in *hydra* involves the canonical Wnt pathway. *Development* 132(12):2907–2916. doi: 10.1242/dev.01848
- Brusse E, Koning I de, Maat-Kievit A, Oostra BA, Heutink P, van Swieten JC (2006) Spinocerebellar ataxia associated with a mutation in the fibroblast growth factor 14 gene (SCA27): A new phenotype. *Mov Disord* 21(3):396–401. doi: 10.1002/mds.20708
- Burdine RD, Chen EB, Kwok SF, Stern MJ (1997) egl-17 encodes an invertebrate fibroblast growth factor family member required specifically for sex myoblast migration in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6):2433–2437
- Campbell RD (1967a) Tissue dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*. II. Patterns of tissue movement. *J Morphol* 121(1):19–28. doi: 10.1002/jmor.1051210103
- Campbell RD (1974) Cell Movements in *Hydra*. *Amer Zool* 14:523–535
- Campbell RD (1967b) Tissue dynamics of steady state growth in *hydra littoralis*. III. Behavior of specific cell types during tissue movements. *J. Exp. Zool.* 164(3):379–391. doi: 10.1002/jez.1401640308

- Campos-Ortega JA, Knust E (1990) Molecular analysis of a cellular decision during embryonic development of *Drosophila melanogaster*: Epidermogenesis or neurogenesis. *Eur J Biochem* 190(1):1–10. doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15538.x
- Cebrià F, Kobayashi C, Umesono Y, Nakazawa M, Mineta K, Ikeo K, Gojobori T, Itoh M, Taira M, Sánchez Alvarado A, Agata K (2002) FGFR-related gene *nou-darake* restricts brain tissues to the head region of planarians. *Nature* 419(6907):620–624. doi: 10.1038/nature01042
- Chamorro MN, Schwartz DR, Vonica A, Brivanlou AH, Cho KR, Varmus HE (2005) FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO J* 24(1):73–84. doi: 10.1038/sj.emboj.7600460
- Chapman JA, Kirkness EF, Simakov O, Hampson SE, Mitros T, Weinmaier T, Rattei T, Balasubramanian PG, Borman J, Busam D, Disbennett K, Pfannkoch C, Sumin N, Sutton GG, Viswanathan LD, Walenz B, Goodstein DM, Hellsten U, Kawashima T, Prochnik SE, Putnam NH, Shu S, Blumberg B, Dana CE, Gee L, Kibler DF, Law L, Lindgens D, Martinez DE, Peng J, Wigge PA, Bertulat B, Guder C, Nakamura Y, Ozbek S, Watanabe H, Khalturin K, Hemmrich G, Franke A, Augustin R, Fraune S, Hayakawa E, Hayakawa S, Hirose M, Hwang JS, Ikeo K, Nishimiya-Fujisawa C, Ogura A, Takahashi T, Steinmetz PRH, Zhang X, Aufschnaiter R, Eder M, Gorny A, Salvenmoser W, Heimberg AM, Wheeler BM, Peterson KJ, Böttger A, Tischler P, Wolf A, Gojobori T, Remington KA, Strausberg RL, Venter JC, Technau U, Hobmayer B, Bosch TCG, Holstein TW, Fujisawa T, Bode HR, David CN, Rokhsar DS, Steele RE (2010) The dynamic genome of *Hydra*. *Nature* 464(7288):592–596. doi: 10.1038/nature08830
- Claus P, Doring F, Gringel S, Muller-Ostermeyer F, Fuhlrott J, Kraft T, Grothe C (2003) Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival of motoneuron protein. *J Biol Chem* 278(1):479–485. doi: 10.1074/jbc.M206056200
- Coulier F, Pontarotti P, Roubin R, Hartung H, Goldfarb M, Birnbaum D (1997) Of worms and men: an evolutionary perspective on the fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor families. *J Mol Evol* 44(1):43–56
- David CN, Campbell RD (1972) Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. I. Epithelial cells. *J Cell Sci* 11(2):557–568

- DeVore DL, Horvitz HR, Stern MJ (1995) An FGF receptor signaling pathway is required for the normal cell migrations of the sex myoblasts in *C. elegans* hermaphrodites. *Cell* 83(4):611–620
- Dubrulle J, Pourquié O. (2004) Coupling segmentation to axis formation. *Development* 131(23):5783–5793. doi: 10.1242/dev.01519
- Durdu S, Iskar M, Revenu C, Schieber N, Kunze A, Bork P, Schwab Y, Gilmour D (2014) Luminal signalling links cell communication to tissue architecture during organogenesis. *Nature* 515(7525):120–124. doi: 10.1038/nature13852
- Echevarria D, Belo JA, Martinez S (2005) Modulation of Fgf8 activity during vertebrate brain development. *Brain Res Brain Res Rev* 49(2):150–157. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.12.035
- Ehebauer M, Hayward P, Arias AM (2006) Notch, a Universal Arbiter of Cell Fate Decisions. *Science. Cell Signaling*.(314(5804)):1414–1415
- Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J (2005) Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(2):139–149. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.001
- Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230):245–246. doi: 10.1038/340245a0
- Furdui CM, Lew ED, Schlessinger J, Anderson KS (2006) Autophosphorylation of FGFR1 kinase is mediated by a sequential and precisely ordered reaction. *Mol Cell* 21(5):711–717. doi: 10.1016/j.molcel.2006.01.022
- Gerber SD, Steinberg F, Beyeler M, Villiger PM, Trueb B (2009) The murine Fgfr1 receptor is essential for the development of the metanephric kidney. *Dev Biol* 335(1):106–119. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.08.019
- Gierer A, Berking S, Bode H, David CN, Flick K, Hansmann G, Schaller H, Trenkner E (1972) Regeneration of hydra from reaggregated cells. *Nature New Biol* 239(91):98–101
- Gilbert SF (2014) *Developmental biology*, 10 // 10. ed. Sinauer Assoc, Sunderland, Mass.

- Goldfarb M, Schoorlemmer J, Williams A, Diwakar S, Wang Q, Huang X, Giza J, Tchetchik D, Kelley K, Vega A, Matthews G, Rossi P, Ornitz DM, D'Angelo E (2007) Fibroblast growth factor homologous factors control neuronal excitability through modulation of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 55(3):449–463. doi: 10.1016/j.neuron.2007.07.006
- Goodman SJ, Branda CS, Robinson MK, Burdine RD, Stern MJ (2003) Alternative splicing affecting a novel domain in the *C. elegans* EGL-15 FGF receptor confers functional specificity. *Development* 130(16):3757–3766
- Gospodarowicz D, Bialecki H, Greenburg G (1978) Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J Biol Chem* 253(10):3736–3743
- Gotoh N (2008) Regulation of growth factor signaling by FRS2 family docking/scaffold adaptor proteins. *Cancer Sci* 99(7):1319–1325. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00840.x
- Guan Y, Zhu Q, Huang D, Zhao S, Lo Jan L, Peng J (2015) An equation to estimate the difference between theoretically predicted and SDS PAGE-displayed molecular weights for an acidic peptide. *Sci Rep* 5:13370. doi: 10.1038/srep13370
- Hanneken A (2001) Structural characterization of the circulating soluble FGF receptors reveals multiple isoforms generated by secretion and ectodomain shedding. *FEBS Lett* 489(2-3):176–181
- Hasse C, Holz O, Lange E, Pisowodzki L, Rebscher N, Eder CM, Hobmayer B, Hassel M (2014) FGFR-ERK signaling is an essential component of tissue separation. *Dev Biol* 395(1):154–166. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.08.010
- Hassel M (1998) Upregulation of a *Hydra vulgaris* cPKC gene is tightly coupled to the differentiation of head structures. *Dev Genes Evol* 207(8):489–501
- Hayashi S, Itoh M, Taira S, Agata K, Taira M (2004) Expression patterns of *Xenopus* FGF receptor-like 1/nou-darake in early *Xenopus* development resemble those of planarian nou-darake and *Xenopus* FGF8. *Dev Dyn* 230(4):700–707. doi: 10.1002/dvdy.20040
- Hemrich G, Anokhin B, Zacharias H, Bosch TCG (2007) Molecular phylogenetics in *Hydra*, a classical model in evolutionary developmental biology. *Mol Phylogenet Evol* 44(1):281–290. doi: 10.1016/j.ympev.2006.10.031

- Hemmrich G, Bosch TCG (2008) Compagen, a comparative genomics platform for early branching metazoan animals, reveals early origins of genes regulating stem-cell differentiation. *Bioessays* 30(10):1010–1018. doi: 10.1002/bies.20813
- Hendrix ND, Wu R, Kuick R, Schwartz DR, Fearon ER, Cho KR (2006) Fibroblast growth factor 9 has oncogenic activity and is a downstream target of Wnt signaling in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res* 66(3):1354–1362. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3694
- Hobmayer B, Rentzsch F, Kuhn K, Happel CM, Laue CC von, Snyder P, Rothbächer U, Holstein TW (2000) WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature* 407(6801):186–189. doi: 10.1038/35025063
- Hobmayer B, Snyder P, Alt D, Happel CM, Holstein TW (2001) Quantitative analysis of epithelial cell aggregation in the simple metazoan Hydra reveals a switch from homotypic to heterotypic cell interactions. *Cell Tissue Res* 304(1):147–157
- Hobmayer B, Jenewein M, Eder D, Eder M, Glasauer S, Gufler S, Hartl M, Salvenmoser W (2012) Stemness in Hydra - a current perspective. *Int J Dev Biol* 56(6-8):509–517. doi: 10.1387/ijdb.113426bh
- Hockman D, Cretekos CJ, Mason MK, Behringer RR, Jacobs DS, Illing N (2008) A second wave of Sonic hedgehog expression during the development of the bat limb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(44):16982–16987. doi: 10.1073/pnas.0805308105
- Holland PW (1999) The future of evolutionary developmental biology. *Nature* 402(6761 Suppl):C41-4. doi: 10.1038/35011536
- Holstein TW, Hobmayer E, David CN (1991) Pattern of epithelial cell cycling in hydra. *Dev Biol* 148(2):602–611
- Holstein TW, Hobmayer E, Technau U (2003) Cnidarians: an evolutionarily conserved model system for regeneration? *Dev Dyn* 226(2):257–267. doi: 10.1002/dvdy.10227
- Holzmann K, Grunt T, Heinzle C, Sampl S, Steinhoff H, Reichmann N, Kleiter M, Hauck M, Marian B (2012) Alternative Splicing of Fibroblast Growth Factor Receptor IgIII Loops in Cancer. *J Nucleic Acids* 2012:950508. doi: 10.1155/2012/950508

- Ibrahimi OA, Yeh BK, Eliseenkova AV, Zhang F, Olsen SK, Igarashi M, Aaronson SA, Linhardt RJ, Mohammadi M (2005) Analysis of mutations in fibroblast growth factor (FGF) and a pathogenic mutation in FGF receptor (FGFR) provides direct evidence for the symmetric two-end model for FGFR dimerization. *Mol Cell Biol* 25(2):671–684. doi: 10.1128/MCB.25.2.671-684.2005
- Itoh N (2010) Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Res* 342(1):1–11. doi: 10.1007/s00441-010-1024-2
- Itoh N, Ornitz DM (2004) Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* 20(11):563–569. doi: 10.1016/j.tig.2004.08.007
- Itoh N, Ornitz DM (2011) Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem* 149(2):121–130. doi: 10.1093/jb/mvq121
- Johnson DE, Lee PL, Lu J, Williams LT (1990) Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol* 10(9):4728–4736
- Johnson DE, Williams LT (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 60:1–41
- Kawakami Y, Capdevila J, Büscher D, Itoh T, Rodríguez Esteban C, Izpisua Belmonte JC (2001) WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* 104(6):891–900
- Kim I, Moon S, Yu K, Kim U, Koh GY (2001) A novel fibroblast growth factor receptor-5 preferentially expressed in the pancreas(1). *Biochim Biophys Acta* 1518(1-2):152–156
- Kimelman D, Xu W (2006) beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25(57):7482–7491. doi: 10.1038/sj.onc.1210055
- Kratochwil K, Galceran J, Tontsch S, Roth W, Grosschedl R (2002) FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in *Lef1*(-/-) mice. *Genes Dev* 16(24):3173–3185. doi: 10.1101/gad.1035602

- Kuznetsov S, Lyanguzowa M, Bosch TC (2001) Role of epithelial cells and programmed cell death in Hydra spermatogenesis. *Zoology (Jena)* 104(1):25–31. doi: 10.1078/0944-2006-00005
- Land M, Islas-Trejo A, Freedman JH, Rubin CS (1994) Structure and expression of a novel, neuronal protein kinase C (PKC1B) from *Caenorhabditis elegans*. PKC1B is expressed selectively in neurons that receive, transmit, and process environmental signals. *J Biol Chem* 269(12):9234–9244
- Lange E, Bertrand S, Holz O, Rebscher N, Hassel M (2014) Dynamic expression of a Hydra FGF at boundaries and termini. *Dev Genes Evol* 224(4-6):235–244. doi: 10.1007/s00427-014-0480-1
- Lee PL, Johnson DE, Cousens LS, Fried VA, Williams LT (1989) Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science* 245(4913):57–60
- Lerner UH, Ohlsson C (2015) The WNT system: background and its role in bone. *J Intern Med* 277(6):630–649. doi: 10.1111/joim.12368
- Lewandoski M, Sun X, Martin GR (2000) Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* 26(4):460–463. doi: 10.1038/82609
- Li Q, Yang H, Zhong TP (2015) Regeneration across metazoan phylogeny: lessons from model organisms. *J Genet Genomics* 42(2):57–70. doi: 10.1016/j.jgg.2014.12.002
- Lin X (2004) Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* 131(24):6009–6021. doi: 10.1242/dev.01522
- Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:781–810. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126
- Mackie GO, Passano LM (1968) Epithelial conduction in hydromedusae. *J Gen Physiol* 52(4):600–621
- Martin G (2001) Making a vertebrate limb: new players enter from the wings. *Bioessays* 23(10):865–868. doi: 10.1002/bies.1126

- Martin GR (1998) The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev* 12(11):1571–1586
- Martin VJ, Littlefield CL, Archer WE, Bode HR (1997) Embryogenesis in hydra. *Biol Bull* 192(3):345–363
- Martínez DE, Iñiguez AR, Percell KM, Willner JB, Signorovitch J, Campbell RD (2010) Phylogeny and biogeography of Hydra (Cnidaria: Hydridae) using mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 57(1):403–410. doi: 10.1016/j.ympev.2010.06.016
- Martoglio B, Dobberstein B (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* 8(10):410–415
- Matus DQ, Thomsen GH, Martindale MQ (2007) FGF signaling in gastrulation and neural development in *Nematostella vectensis*, an anthozoan cnidarian. *Dev Genes Evol* 217(2):137–148. doi: 10.1007/s00427-006-0122-3
- McAvoy JW, Chamberlain CG (1989) Fibroblast growth factor (FGF) induces different responses in lens epithelial cells depending on its concentration. *Development* 107(2):221–228
- Meinhardt H (2002) The radial-symmetric hydra and the evolution of the bilateral body plan: an old body became a young brain. *Bioessays* 24(2):185–191. doi: 10.1002/bies.10045
- Miller MA, Technau U, Smith KM, Steele RE (2000) Oocyte development in Hydra involves selection from competent precursor cells. *Dev Biol* 224(2):326–338. doi: 10.1006/dbio.2000.9790
- Mohammadi M, Honegger AM, Rotin D, Fischer R, Bellot F, Li W, Dionne CA, Jaye M, Rubinstein M, Schlessinger J (1991) A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1. *Mol Cell Biol* 11(10):5068–5078
- Mohammadi M, McMahon G, Sun L, Tang C, Hirth P, Yeh BK, Hubbard SR, Schlessinger J (1997) Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* 276(5314):955–960

- Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahimi OA (2005) Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(2):107–137. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.008
- Mookerjee S, Bhattacharjee A (1967) Regeneration time at the different levels of hydra. *W. Roux' Archiv f. Entwicklungsmechanik* 158(3):301–314. doi: 10.1007/BF00573401
- Moon AM, Capecchi MR (2000) Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat Genet* 26(4):455–459. doi: 10.1038/82601
- Naiche LA, Holder N, Lewandoski M (2011) FGF4 and FGF8 comprise the wavefront activity that controls somitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(10):4018–4023. doi: 10.1073/pnas.1007417108
- Nishimiya-Fujisawa C, Kobayashi S (2012) Germline stem cells and sex determination in Hydra. *Int J Dev Biol* 56(6-8):499–508. doi: 10.1387/ijdb.123509cf
- Nybakken K, Perrimon N (2002) Heparan sulfate proteoglycan modulation of developmental signaling in Drosophila. *Biochim Biophys Acta* 1573(3):280–291
- Ohno S (1999) Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-1999. *Semin Cell Dev Biol* 10(5):517–522. doi: 10.1006/scdb.1999.0332
- Ohshiro T, Emori Y, Saigo K (2002) Ligand-dependent activation of breathless FGF receptor gene in Drosophila developing trachea. *Mech Dev* 114(1-2):3–11
- Olsen SK, Ibrahimi OA, Raucci A, Zhang F, Eliseenkova AV, Yayon A, Basilico C, Linhardt RJ, Schlessinger J, Mohammadi M (2004) Insights into the molecular basis for fibroblast growth factor receptor autoinhibition and ligand-binding promiscuity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(4):935–940. doi: 10.1073/pnas.0307287101
- Ong SH, Hadari YR, Gotoh N, Guy GR, Schlessinger J, Lax I (2001) Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11):6074–6079. doi: 10.1073/pnas.111114298

- Ornitz DM (2000) FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* 22(2):108–112. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<108:AID-BIES2>3.0.CO;2-M
- Ornitz DM, Itoh N (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2(3):REVIEWS3005
- Ornitz DM, Itoh N (2015) The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4(3):215–266. doi: 10.1002/wdev.176
- Otto JJ, Campbell RD (1977) Budding in *Hydra attenuata*: bud stages and fate map. *J Exp Zool* 200(3):417–428. doi: 10.1002/jez.1402000311
- Oulion S, Bertrand S, Escriva H (2012) Evolution of the FGF Gene Family. *Int J Evol Biol* 2012:298147. doi: 10.1155/2012/298147
- Pellegrini L (2001) Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view. *Curr Opin Struct Biol* 11(5):629–634
- Perantoni AO, Timofeeva O, Naillat F, Richman C, Pajni-Underwood S, Wilson C, Vainio S, Dove LF, Lewandoski M (2005) Inactivation of FGF8 in early mesoderm reveals an essential role in kidney development. *Development* 132(17):3859–3871. doi: 10.1242/dev.01945
- Petit V, Nussbaumer U, Dossenbach C, Affolter M (2004) Downstream-of-FGFR is a fibroblast growth factor-specific scaffolding protein and recruits Corkscrew upon receptor activation. *Mol Cell Biol* 24(9):3769–3781
- Philipp I, Aufschnaiter R, Ozbek S, Pontasch S, Jenewein M, Watanabe H, Rentzsch F, Holstein TW, Hobmayer B (2009) Wnt/beta-catenin and noncanonical Wnt signaling interact in tissue evagination in the simple eumetazoan *Hydra*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(11):4290–4295. doi: 10.1073/pnas.0812847106
- Popovici C, Conchonaud F, Birnbaum D, Roubin R (2004) Functional phylogeny relates LET-756 to fibroblast growth factor 9. *J Biol Chem* 279(38):40146–40152. doi: 10.1074/jbc.M405795200
- Popovici C, Roubin R, Coulier F, Birnbaum D (2005) An evolutionary history of the FGF superfamily. *Bioessays* 27(8):849–857. doi: 10.1002/bies.20261

- Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7(3):165–197
- Prochiantz A, Théodore L (1995) Nuclear/growth factors. *Bioessays* 17(1):39–44. doi: 10.1002/bies.950170109
- Raballo R, Rhee J, Lyn-Cook R, Leckman JF, Schwartz ML, Vaccarino FM (2000) Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 20(13):5012–5023
- Rebscher N, Deichmann C, Sudhop S, Fritzenwanker JH, Green S, Hassel M (2009) Conserved intron positions in FGFR genes reflect the modular structure of FGFR and reveal stepwise addition of domains to an already complex ancestral FGFR. *Dev Genes Evol* 219(9-10):455–468. doi: 10.1007/s00427-009-0309-5
- Rentzsch F, Fritzenwanker JH, Scholz CB, Technau U (2008) FGF signalling controls formation of the apical sensory organ in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Development* 135(10):1761–1769. doi: 10.1242/dev.020784
- Rieckmann T, Kotevic I, Trueb B (2008) The cell surface receptor FGFR1 forms constitutive dimers that promote cell adhesion. *Exp Cell Res* 314(5):1071–1081. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.10.029
- Rodriguez-Enfedaque A, Bouleau S, Laurent M, Courtois Y, Mignotte B, Vayssière J, Renaud F (2009) FGF1 nuclear translocation is required for both its neurotrophic activity and its p53-dependent apoptosis protection. *Biochim Biophys Acta* 1793(11):1719–1727. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.09.010
- Rudolf A, Hübinger C, Hüsken K, Vogt A, Rebscher N, Onel S, Renkawitz-Pohl R, Hassel M (2013) The Hydra FGFR, Kringelchen, partially replaces the *Drosophila* Heartless FGFR. *Dev Genes Evol* 223(3):159–169. doi: 10.1007/s00427-012-0424-6
- Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N (1987) Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology* 5(1):27–37. doi: 10.1080/02726358708904533

- Sarras MP, Deutzmann R (2001) Hydra and Niccolo Paganini (1782-1840)--two peas in a pod? The molecular basis of extracellular matrix structure in the invertebrate, Hydra. *Bioessays* 23(8):716–724. doi: 10.1002/bies.1101
- Sarras MP, Madden ME, Zhang XM, Gunwar S, Huff JK, Hudson BG (1991) Extracellular matrix (mesoglea) of Hydra vulgaris. I. Isolation and characterization. *Dev Biol* 148(2):481–494
- Sarras MP (2012) Components, structure, biogenesis and function of the Hydra extracellular matrix in regeneration, pattern formation and cell differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 56(6-7-8):567–576. doi: 10.1387/ijdb.113445ms
- Satou Y, Imai KS, Satoh N (2002) Fgf genes in the basal chordate Ciona intestinalis. *Dev Genes Evol* 212(9):432–438. doi: 10.1007/s00427-002-0266-8
- Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M (2000) Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell* 6(3):743–750
- Shakkottai VG, Xiao M, Xu L, Wong M, Nerbonne JM, Ornitz DM, Yamada KA (2009) FGF14 regulates the intrinsic excitability of cerebellar Purkinje neurons. *Neurobiol Dis* 33(1):81–88. doi: 10.1016/j.nbd.2008.09.019
- Sharma R, Beer K, Iwanov K, Schmöhl F, Beckmann PI, Schröder R (2015) The single fgf receptor gene in the beetle Tribolium castaneum codes for two isoforms that integrate FGF8- and Branchless-dependent signals. *Dev Biol* 402(2):264–275. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.04.001
- Shimizu H, Aufschnaiter R, Li L, Sarras MP, Borza D, Abrahamson DR, Sado Y, Zhang X (2008) The extracellular matrix of hydra is a porous sheet and contains type IV collagen. *Zoology (Jena)* 111(5):410–418. doi: 10.1016/j.zool.2007.11.004
- Shimizu H, Takaku Y, Zhang X, Fujisawa T (2007) The aboral pore of hydra: evidence that the digestive tract of hydra is a tube not a sac. *Dev Genes Evol* 217(8):563–568. doi: 10.1007/s00427-007-0165-0

- Shimokawa T, Furukawa Y, Sakai M, Li M, Miwa N, Lin Y, Nakamura Y (2003) Involvement of the FGF18 gene in colorectal carcinogenesis, as a novel downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex. *Cancer Res* 63(19):6116–6120
- Shishido E, Higashijima S, Emori Y, Saigo K (1993) Two FGF-receptor homologues of *Drosophila*: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos. *Development* 117(2):751–761
- Sleeman M, Fraser J, McDonald M, Yuan S, White D, Grandison P, Kumble K, Watson JD, Murison JG (2001) Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene* 271(2):171–182
- Stathopoulos A, Tam B, Ronshaugen M, Frasch M, Levine M (2004) *pyramus* and *thisbe*: FGF genes that pattern the mesoderm of *Drosophila* embryos. *Genes Dev* 18(6):687–699. doi: 10.1101/gad.1166404
- Steinberg F, Gerber SD, Rieckmann T, Trueb B (2010b) Rapid fusion and syncytium formation of heterologous cells upon expression of the FGFR1 receptor. *J Biol Chem* 285(48):37704–37715. doi: 10.1074/jbc.M110.140517
- Steinberg F, Zhuang L, Beyeler M, Kälin RE, Mullis PE, Brändli AW, Trueb B (2010a) The FGFR1 receptor is shed from cell membranes, binds fibroblast growth factors (FGFs), and antagonizes FGF signaling in *Xenopus* embryos. *J Biol Chem* 285(3):2193–2202. doi: 10.1074/jbc.M109.058248
- Sudhop S (2006) Knospung-steuernde Gene aus *Hydra vulgaris*: Knospung-steuernde Gene aus *Hydra vulgaris*: Ein evolutionsgeschichtlich alter FGFR kontrolliert die Knospenablösung. Philipps Universität Marburg
- Sudhop S, Coulier F, Bieller A, Vogt A, Hotz T, Hassel M (2004) Signalling by the FGFR-like tyrosine kinase, *Kringelchen*, is essential for bud detachment in *Hydra vulgaris*. *Development* 131(16):4001–4011. doi: 10.1242/dev.01267
- Sun X, Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR (1999) Targeted disruption of *Fgf8* causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev* 13(14):1834–1846

- Sutherland D, Samakovlis C, Krasnow MA (1996) branchless encodes a Drosophila FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* 87(6):1091–1101
- Takahashi T, Koizumi O, Ariura Y, Romanovitch A, Bosch TC, Kobayakawa Y, Mohri S, Bode HR, Yum S, Hatta M, Fujisawa T (2000) A novel neuropeptide, Hym-355, positively regulates neuron differentiation in Hydra. *Development* 127(5):997–1005
- Thisse B, Thisse C (2005) Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol* 287(2):390–402. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.09.011
- Tripp K (1928) Die Regenerationsfähigkeit von Hydren in den verschiedenen Körperregionen. Nach Regenerations- und Transplantationsversuchen. *Z. wiss Zool.*, 132:476–525
- Trueb B (2011) Biology of FGFR1, the fifth fibroblast growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 68(6):951–964. doi: 10.1007/s00018-010-0576-3
- Trueb B, Neuhauss SCF, Baertschi S, Rieckmann T, Schild C, Taeschler S (2005) Fish possess multiple copies of fgfr1, the gene for a novel FGF receptor. *Biochim Biophys Acta* 1727(1):65–74. doi: 10.1016/j.bbaexp.2004.12.001
- Trueb B, Zhuang L, Taeschler S, Wiedemann M (2003) Characterization of FGFR1, a novel fibroblast growth factor (FGF) receptor preferentially expressed in skeletal tissues. *J Biol Chem* 278(36):33857–33865. doi: 10.1074/jbc.M300281200
- Urness LD, Bleyl SB, Wright TJ, Moon AM, Mansour SL (2011) Redundant and dosage sensitive requirements for Fgf3 and Fgf10 in cardiovascular development. *Dev Biol* 356(2):383–397. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.05.671
- Vincent S, Wilson R, Coelho C, Affolter M, Leptin M (1998) The Drosophila protein Dof is specifically required for FGF signaling. *Mol Cell* 2(4):515–525
- Wenger Y, Galliot B (2013) RNAseq versus genome-predicted transcriptomes: A large population of novel transcripts identified in an Illumina-454 Hydra transcriptome. *BMC Genomics* 14(1):204. doi: 10.1186/1471-2164-14-204

- Wiedemann M, Trueb B (2000) Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors. *Genomics* 69(2):275–279. doi: 10.1006/geno.2000.6332
- Wilby OK, Webster G (1970) Experimental studies on axial polarity in hydra. *J Embryol Exp Morphol* 24(3):595–613
- Wittlieb J, Khalturin K, Lohmann JU, Anton-Erxleben F, Bosch TCG (2006) Transgenic Hydra allow in vivo tracking of individual stem cells during morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(16):6208–6211. doi: 10.1073/pnas.0510163103
- Wolpert L, Clarke MR, Hornbruch A (1972) Positional signalling along hydra. *Nature New Biol* 239(91):101–105
- Wu QF, Yang L, Li S, Wang Q, Yuan XB, Gao X, Bao L, Zhang X (2012) Fibroblast growth factor 13 is a microtubule-stabilizing protein regulating neuronal polarization and migration. *Cell* 149(7):1549–1564. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.046
- Xiao M, Xu L, Laezza F, Yamada K, Feng S, Ornitz DM (2007) Impaired hippocampal synaptic transmission and plasticity in mice lacking fibroblast growth factor 14. *Mol Cell Neurosci* 34(3):366–377. doi: 10.1016/j.mcn.2006.11.020
- Xu J, Liu Z, Ornitz DM (2000) Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures. *Development* 127(9):1833–1843
- Xu J, Nakahara M, Crabb JW, Shi E, Matuo Y, Fraser M, Kan M, Hou J, McKeenhan WL (1992) Expression and immunochemical analysis of rat and human fibroblast growth factor receptor (flg) isoforms. *J Biol Chem* 267(25):17792–17803
- Yang X, Dormann D, Münsterberg AE, Weijer CJ (2002) Cell movement patterns during gastrulation in the chick are controlled by positive and negative chemotaxis mediated by FGF4 and FGF8. *Dev Cell* 3(3):425–437
- Zhang X, Bao L, Yang L, Wu Q, Li S (2012) Roles of intracellular fibroblast growth factors in neural development and functions. *Sci China Life Sci* 55(12):1038–1044. doi: 10.1007/s11427-012-4412-x

- Zhu X, Komiya H, Chirino A, Faham S, Fox GM, Arakawa T, Hsu BT, Rees DC (1991) Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science* 251(4989):90–93
- Zhuang L, Bluteau G, Trueb B (2015) Phylogenetic analysis of receptor FgfrL1 shows divergence of the C-terminal end in rodents. *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol* 186:43–50. doi: 10.1016/j.cbpb.2015.04.009

7 Anhang

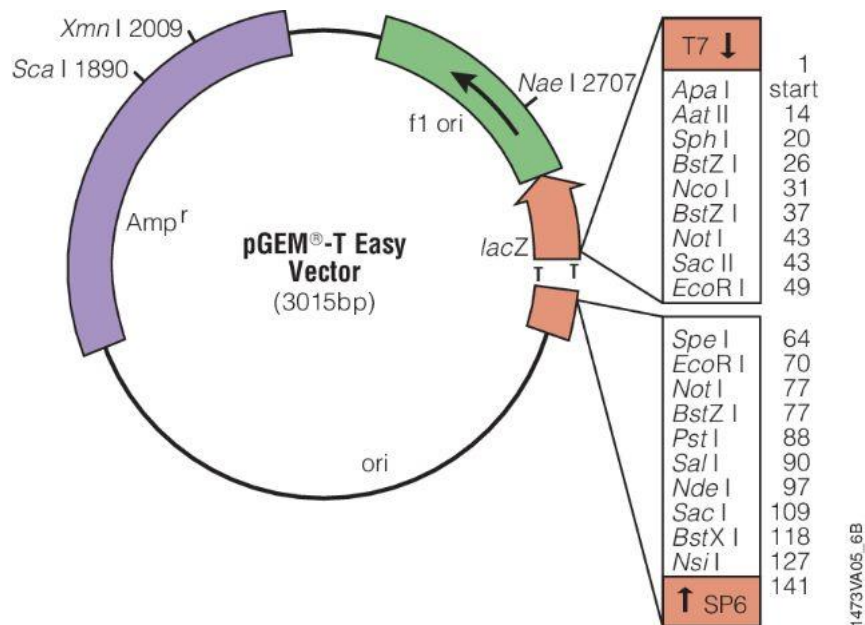


Abbildung 7.1: pGEM-T Easy Vektorkarte.

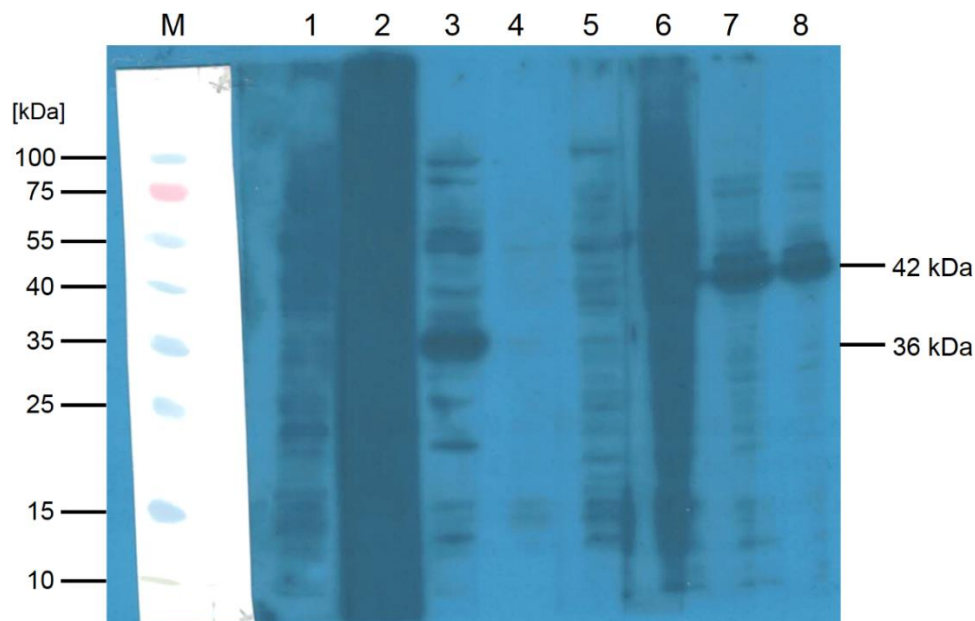


Abbildung 7.2: Western-Blot für präabsorbierten Antikörper gegen FGFRa, FGF-f und HvFGFRL1.

Spur M: Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Spur 1: α -FGFRa, 1:500 aus Kaninchen 1. Spur 2: α -FGFRa präabsorbiert, 1:500 aus Kaninchen 1. Spur 3: α -FGF-f, 1:500 aus Kaninchen 1. Spur 4: α -FGF-f präabsorbiert, 1:500 auch Kaninchen 1. Spur 5: α -HvFGFRL1 1:500 aus Kaninchen 1. Spur 6: α -HvFGFRL1 präabsorbiert, 1:500 aus Kaninchen 1. Spur 7, 8: α -Aktin (positiv Kontrolle), 1:20.000, 42 kDa, 36 kDa: Größe der erwarteten FGF-f Bande. Für den Nachweis per Chemolumineszenz (ECL) auf Röntgenfilm wurden die einzelnen, mit verschiedenen AK behandelten Membranspuren in ihrer ursprünglichen Reihenfolge wieder zusammengelegt. Belichtungszeit: 1 min.

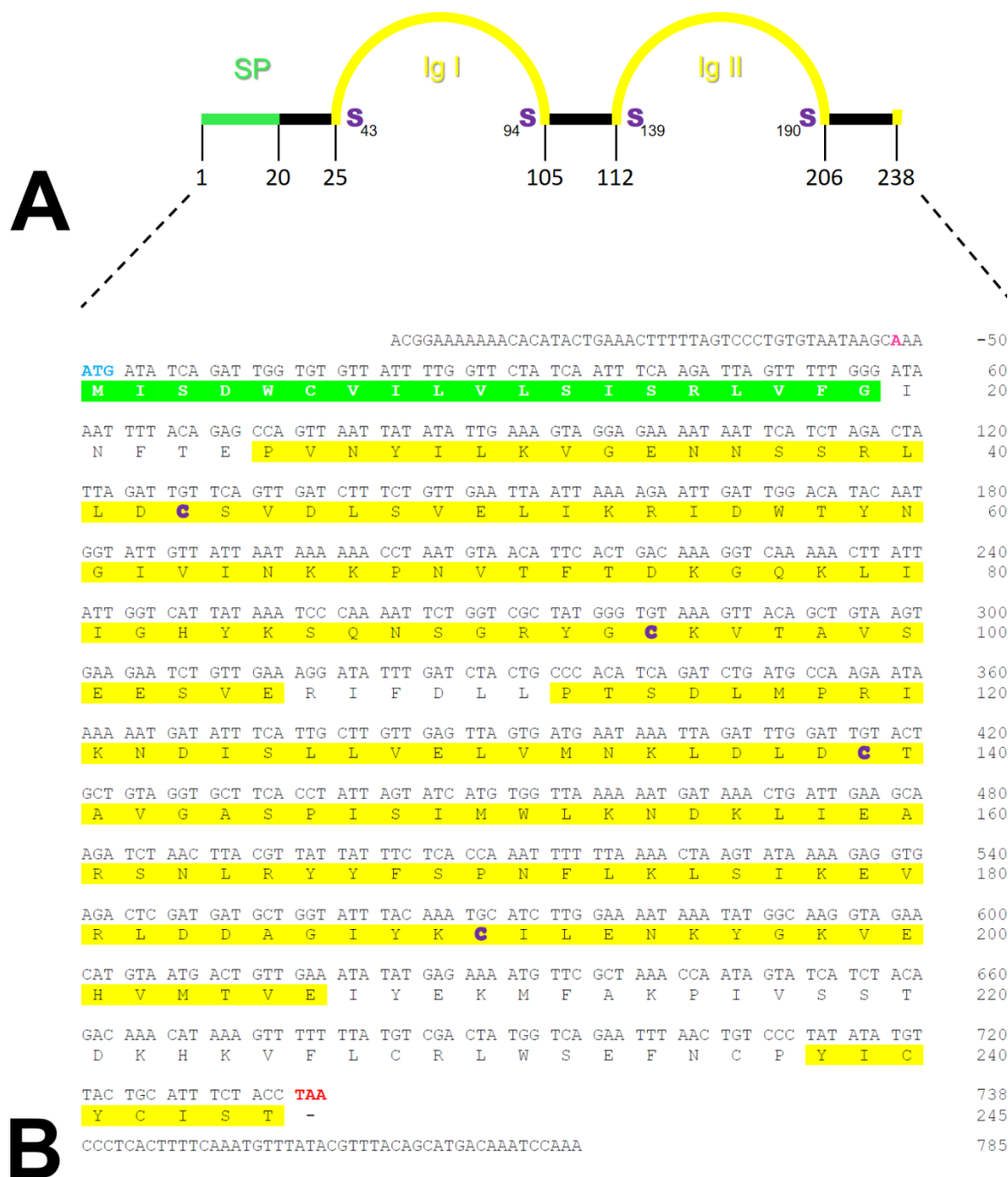


Abbildung 7.3: Struktur und abgeleitete Proteinsequenz von FGFRb_ex, aus der Compagen Datenbank.

(A) Struktur von FGFRb_ex, abgeleitet aus der Nukleotidsequenz, grün: Signalpeptid (SP), gelb: Ig-ähnlichen Schleifen I-III, violetten S: Disulfidbrücken, 1-138: AS die Anfang/Ende einzelner Domänen markieren. (B) Nukleotid- und daraus abgeleitete Proteinsequenz von FGFRb_ex, pink: Kozak-Kriterium, hellblau: Start-Codon, rot: Stopp-Codon, grün unterlegt: Signalpeptid, gelb unterlegt: Ig-ähnlichen Schleifen I-III, violett: Cysteine für die Bildung Ig-ähnlicher Schleifen.

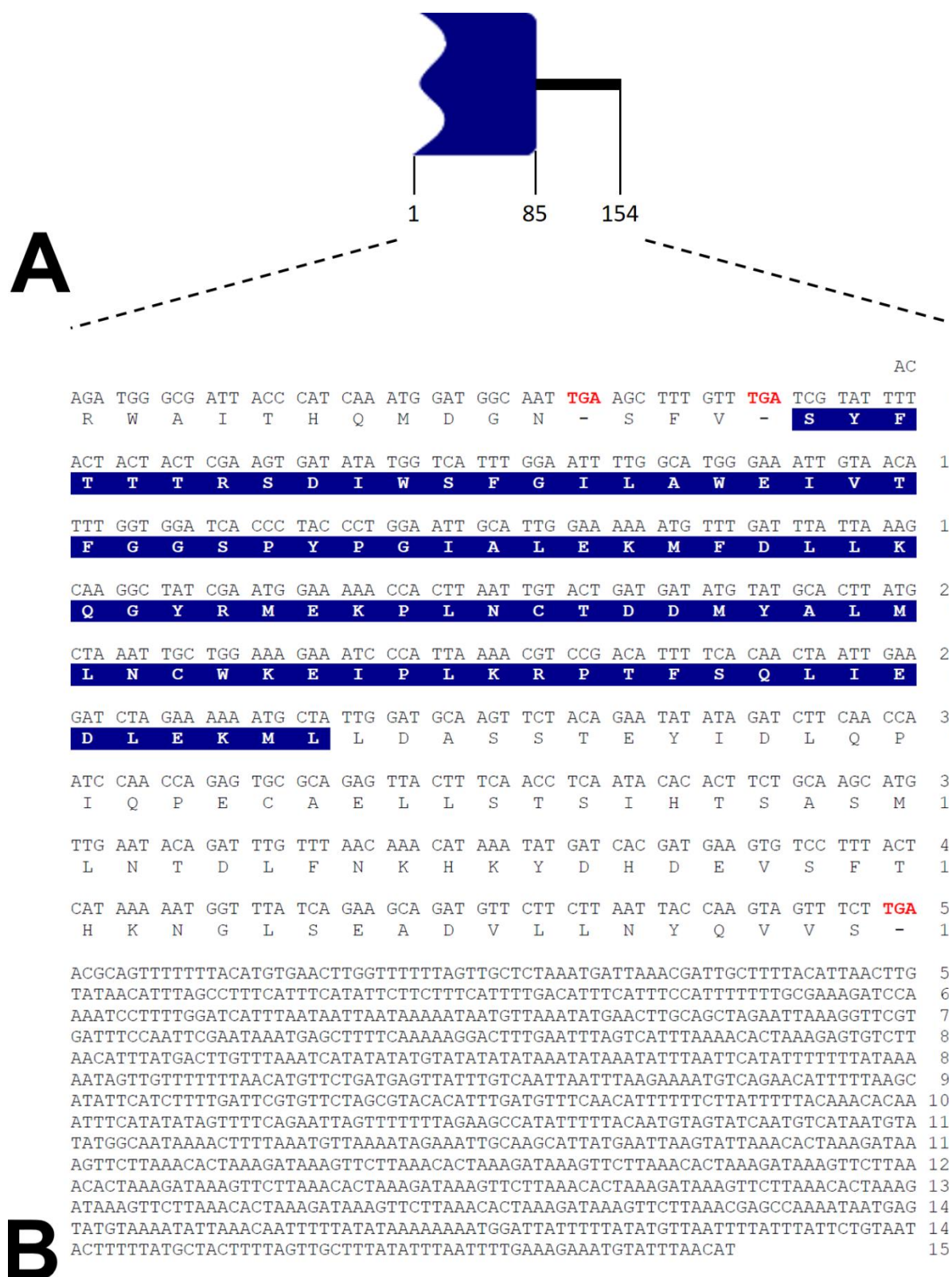


Abbildung 7.4: Struktur und abgeleitete Proteinsequenz von FGFRb_in, aus der Compagen Datenbank.

(A) Struktur von FGFRb_in, abgeleitet aus der Nukleotidsequenz, blau: N-Terminus der Tyrosin Kinase Domäne, 1-154: AS die Anfang/Ende einzelner Domänen markieren. (B) Nukleotid- und daraus abgeleitete Proteinsequenz von FGFRb_in, rot: Stopp-Codons, dunkelblau unterlegt: N-Terminus der Tyrosin Kinase Domäne.

	20	40	60	80	100	
FFGFRa	---	---	---	---	---	---
FFGFRb_ex	---	---	---	---	---	---
FFGFRb_in	---	---	---	---	---	---
FFGFRa	120	140	160	180	200	220
FFGFRb_ex	---	---	---	---	---	---
FFGFRb_in	---	---	---	---	---	---
FFGFRa	240	260	280	300	320	340
FFGFRb_ex	---	---	---	---	---	---
FFGFRb_in	---	---	---	---	---	---
FFGFRa	360	380	400	420	440	460
FFGFRb_ex	---	---	---	---	---	---
FFGFRb_in	---	---	---	---	---	---
FFGFRa	480	500	520	540	560	580
FFGFRb_ex	---	---	---	---	---	---
FFGFRb_in	---	---	---	---	---	---
FFGFRa	600	620	640	660	680	700
FFGFRb_ex	---	---	---	---	---	---
FFGFRb_in	---	---	---	---	---	---
FFGFRa	720	740	760	780	800	820
FFGFRb_ex	---	---	---	---	---	---
FFGFRb_in	---	---	---	---	---	---
FFGFRa	840	860	880	900	920	940
FFGFRb_ex	---	---	---	---	---	---
FFGFRb_in	---	---	---	---	---	---

▲Abbildung 7.5: Aminosäuresequenz-Alignment von FGFRa und FGFRb-Fragmenten aus der Compagen Datenbank.

Das Alignment macht deutlich, dass die Sequenz für die dritte Ig-ähnliche Schleife, die Transmembrandomäne und der N-terminale Teil der Tyrosinkinase-Domäne fehlen. FGFRb_ex: extrazelluläres Fragment von FGFRb. FGFRb_in: intrazelluläres Fragment von FGFRb. Grüne Linie: Signalpeptid, gelbe Linien: Ig-ähnliche Schleifen I-III von FGFRa, graue Linie: Transmembran-Domäne, dunkelblaue Linien: Tyrosinkinase-Domäne von FGFRa.

[illegible]

▲Abbildung 7.6: Alignment der Nukleotidsequenzen von FGFRa, FGFRb1 und b2 und FGFRb-Fragmenten aus der Compagen Datenbank.

FGFRa: NCBI-Sequenz AAO39416. FGFRb1: Sequenz von FGFRb, erhalten durch Neusequenzierung. FGFRb2: Sequenz FGFRb mit Rasterschub im C-terminalen Teil der Tyrosinkinase-Domäne. FGFRb_Comp: unveränderte Sequenzfragmente (FGFRb_ex und FGFRb_in) aus der Compagen Datenbank. Grüne Linien: Signalpeptid, gelbe Linien: Ig-ähnliche Schleifen I-III, graue Linie: Transmembran-Domäne, dunkelblaue Linien: Tyrosinkinase-Domäne, braun umrandet: *forward* und *reverse* Primer zur Überprüfung der Compagen-Sequenz FGFRb_ex., rot umrandet: *forward* und *reverse* Primer zur Ermittlung, ob die FGFRb_ex Sequenz ein Stop-Codon enthält, orange umrandet: *forward* und *reverse* Primer zur Ermittlung des fehlenden Mittelstücks von FGFRb und Überprüfung des Rasterschubs in FGFRb_in, violett umrandet: *forward* und *reverse* Primer zur Überprüfung der Compagen-Sequenz FGFRb_in, pinker Stern: Rasterschub in der FGFR_in Sequenz.

acggaaaaaaacacatactgaaacttttttagtcctgtgtaataagcaaaatgatatcag	60
T E K N T Y - N F L V P V - - A K - Y Q	
R K K T H T E T F - S L C N K Q N D I R	20
G K K H I L K L F S P C V I S K M I S D	
attggtgtgttatttttgggttctatcaatttcaagattagtttttgggataaatttttacag	120
I G V L F W F Y Q F Q D - F L G - I L Q	
L V C Y F G S I N F K I S F W D K F Y R	40
W C V I L V L S I S R L V F G I N F T E	
agccagttaattatatattgaaagtaggagaaaaataattcatctagactatttagattgtt	180
S Q L I I Y - K - E K I I H L D Y - I V	
A S - L Y I E S R R K - F I - T I R L F	60
P V N Y I L K V G E N N S S R L L D C S	
cagttgatcttttctgttgaattaattaaaagaattgattggacatacaatggtattgtta	240
Q L I F L L N - L K E L I G H T M V L L	
S - S F C - I N - K N - L D I Q W Y C Y	80
V D L S V E L I K R I D W T Y N G I V I	
ttaataaaaaacctaattgtaacattcactgacaaagggtcaaaaacttattattggtcatt	300
L I K N L M - H S L T K V K N L L L V I	
- - K T - C N I H - Q R S K T Y Y W S L	100
N K K P N V T F T D K G Q K L I I G H Y	
ataaatcccaaaattctggtcgctatgggtgtaaagttacagctgtaagtgaagaatctg	360
I N P K I L V A M G V K L Q L - V K N L	
- I P K F W S L W V - S Y S C K - R I C	120
K S Q N S G R Y G C K V T A V S E E S V	
ttgaaaggatatttgatctactgccacatcagatctgatgccagaataaaaaaatgata	420
L K G Y L I Y C P H Q I - C Q E - K M I	
- K D I - S T A H I R S D A K N K K - Y	140
E R I F D L L P T S D L M P R I K N D I	
tttcattgcttgttgagtttagtgatgaataaattagatttggattgtactgctgtagggtg	480
F H C L L S - - - I N - I W I V L L - V	
F I A C - V S D E - I R F G L Y C C R C	160
S L L V E L V M N K L D L D C T A V G A	
cttcacctatttagtatcatgtggttaaaaaatgataaactgattgaagcaagatctaact	540
L H L L V S C G - K M I N - L K Q D L T	
F T Y - Y H V V K K - - T D - S K I - L	180
S P I S I M W L K N D K L I E A R S N L	
tacgttattattttctcaccaaattttttaaaactaagtataaaaagaggtgagactcgatg	600
Y V I I S H Q I F - N - V - K R - D S M	
T L L F L T K F F K T K Y K R G E T R -	200
R Y Y F S P N F L K L S I K E V R L D D	
atgctggtattttacaaatgcacatcttggaaaaataaatatggcaaggtagaacatgtaatga	660
M L V F T N A S W K I N M A R - N M - -	
C W Y L Q M H L G K - I W Q G R T C N D	220
A G I Y K C I L E N K Y G K V E H V M T	
ctgttgaaatatatgagaaaatgttcgctaacaatagttatcatctacagacaaacata	720
L L K Y M R K C S L N Q - Y H L Q T N I	
C - N I - E N V R - T N S I I Y R Q T -	240
V E I Y E K M F A K P I V S S T D K H K	
aagtttttttatgtcgactatgggcagaatttaactgtcctatatatgttactgcattt	780
K F F Y V D Y G Q N L T V P I Y V T A F	
S F F M S T M V R I - L S L Y M L L H F	260
V F L C R L W S E F N C P Y I C Y C I S	
ctacctaaccctcacttttcaaatgtttatacgtttacagcatgacaaatccaaa	835
L P N P H F S N V Y T F T A - Q I Q	
Y L T L T F Q M F I R L Q H D K S K	277
T - P S L F K C L Y V Y S M T N P	

Abbildung 7.7: Möglicher Rasterschub an Ende der Compagen-Sequenz FGFRb_ex.

Durch das Weglassen der fett gedruckten Thymine ändert sich das Leseraster. Abgeleitete Proteinsequenzen: blau: Leseraster 1, grün: Leseraster 2, orange: Leseraster 3. Die jeweilige

Aminosäure steht immer unter dem mittleren Nukleotid, des codierenden Triplets. Bindestriche: Stop-Codons.

>FGF-a

AGTACGCGGGACGACGGAAAAAACACATACTGAAACTTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGTTAAAC
ATATGGAAATACTGAACAAAGAAAAAAGAAAAGTCTACAAAATTGATAAAATTTCAACTACTT
CGATTTGCAAGAAGGCGGAGAATTTTATGTAAAAATGGTATGTACTTAGCAATAGACAAAAATGG
CGTTCATGGAACAAAAGATCCAAAAATCCATACGCTGACCTTCAAGTATTATCAATTGGCTCAG
ATATGCTTGCATTTTGGGGAACAAAAGCATGCTTGTACCTTGCTGTAAATGCACAACTGGCCAA
ATTTACACCACACCAGATGAAGGACAGCATTGCGTTTTTCTAGAGTCTATCACACCTGACTTTTA
TAATTTCTATGAAAGCTACCGTTCAGTATATGATGGTCAACCACAATGTTTAATTCTAAATGCTC
AAAACAACTTATTATTGCTGATACTGGAACCATTATAGAAAAAATGGACAATTTATTTGGGAA
CTGTTTGATGATGCTTATGAGAAATACAAATAATATAACGATTGACACTAGATTTATAATTTATC
ACATGATCACATGACTTCTTA

>FGF-b

CGGTAGAGTACGCGGGGACGGAAAAAACACATACTGAAACTTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGTG
AACACTAGTTTTTAAAATGATATTGCTTCAAAGTTTTTTTGAAGACAATTTTTATTTTTGTTG
TGGTTAAACTATCGCAACCAGTACCAACCTTGATGCCAAGAAATGTAAACTGTCTTTAATTAAA
GATGAAATGGTAAATACCTAAAACATCCTTCTTATAAAAAAGCGTATTGCTCTATTCAAAGCA
AGGTTATTTTTTATCGATTGCAGACGACGGGAAATATATGGAACCTCATGATGGATTTTCACCTG
ATGCTCAGCTAGAAGTACAGTCATTTGGAGTGAACATAAACGTATAAGAAAACCTAACTCATGG
TATCTATCAATTGATAAAAACGGCGCAGTAAAAGCTGAGAATGATCCAAAAACGAACTTTATT
CCAAGAAGTAATCGATAAAGAAGGTTGGGCAATATACCGTAATGATTTAACTGGATATCTACTTG
CGTTCAATAAAAATGGAAAATTACAACAAAACCTGAAGAGCTCTAAAGTAAAAATAAAGCAAAG
TTTCTACTTCTTTCTTCTTTTCTAGTGGTGGAAAAAGCAGAAAGCATAAAAAAAAAACTTTGAA
AAGATTCTTTAAATATGATAGGTGTAAATAATGTAAATAAAAAAGACAAAAATTAATTTTATTAC
CAACCGCTCCGCTTTATATTTATAGTTCAAAGCTTTAAGAATTTATATGTCAATAAATTATAA
TAATTTATGTAAATATTTAAA

>FGF-c

CTTTTAGAATAAAAACTTAGTTTTTGCTAAATGAAGTTCTACTTTTTAGTGTTTCTGACTTACA
TTGATAATGGTAATAGCCAACCTATCGGAATATCCGCACAAAAAGAAGAGTTAAATGATTTTACG
TTGCAAAAGGAATGGAGCGCAGTTTCAAGAAACACCTGAAAAAATGAAAAACATCATAAACCTAT
CCTCACAAAAGAAGTTAATCTTATTTTTGATAAATGGGGAAACTGCAAGCTAGCATTTGTTGTATT
GTCGAAATGGATTTTACATTGATATTACAAATAACAACGTGGTTGGGGTTTCTTATAAAAGTTTC
ATAACAAATGAAACAGGTTTATTTCAAATAGAAACGTATGGTAAAAGTTTCGTTATGTTAAAGCA
TGTA AAAACAAATAACTATATTGCAATGAATAATGAAGGAAAACCTGCACTCGTCGGAAACAAAGA
CGGACGAATGTTTATTCTATTATTATTGGAGAAAGGAGAATACGCAACTTTTTCTTCTGCAAAA
TATTTTGTTAACGATTATTACGATTTGTACATAAGTTTAAAGAAAACCTGGAAAATTACGTAAGGC
CAATCATTTCAACACCATTTCAACGCTCATCTCAGTTTGAAATAATTCCAAAGATATCTGAAAAAG
ATCAACTGTGCATCCGAAGATGAAGTAGTACCAATATCAAACCGACTATAAATGGCTTGTGGTT
TTATGGCAATAAAAAAAAAGTTTTTACTCAGCATACAAAACCTTTGGCATTAAATAAATCTGCAA
TCATTCTAGGACAGTAGTTACTCGAGTCAGCTCCTCTTTAATTAATGCTTTTTTAAAAACATCTT
TTTAGCAATATGCAGCAATATAAAGTTCAAGCTTTTGTATATACTTATTTATGTATATAAAGATA
TATTTGACCT

>FGF-e

GAAGTAAGTTCATATATTCAAAGAAAAATCAAATTTTATTTGATAAATAAAGAAAATGTATATT
TACAATTTTATTGTTTGATTTAAAAAATATTTTGTGACTACTCTATATTATACAGAAAAAAGG
TTTGAAAAATAATTAAACGAATCGTTGATAATGGTTGGAGCACTGGACGTGTTAGAAATTAGAAAAT
AAGTTTTTTTTTCGATTCCGTAGCGTGACGTTAGCTATTTTATTTTTTGGTTTTCCGTTTTGTTGC
AGACCAAGCACAAAACCTGTTGCATCATTTTGAAAATATGCCCATCCTGCATCGTTATACATGAC
CCGAAATAATGTATCTTTTCTTCCATATTTCTTGTTTTTATAATTCCAAGTTTGTCAATAGCTA
TATACCATGAGTTTGGTTTTCGAAACCTTTTAAATACACTCCGTATGACTCAACTTCAAAAAA
ATATCACGTGATTTAGTATCCAGTGTTCCCATAAATGTTTCCACTTTCGTTTATTGTTAAATAATA

TCCAAGCTTTGAATAGAGAAATACCGTGGTAGTGTATGAAGGTGTTGTTATGTTTTTATAAAGCA
AATCATTTTTTATAGATATCTTTAGCTTGCTTTTCGTCCTATCTTGCAATGATGGATCCAATAAT
ACTTCTGGTTTATTTCTTTGAATAGTCGTTTCATCATTTTGAAATGAAGTTTTTCATTAGACACAT
AATCGCAGAGAGAAAAAATAGGTTTCATCAACATCGTGAATCTCCGTAATAAATTTTCGTAGTTTTG
TTTATAAATCTTTCTTATACTTTAATAACTTTTTTATATCTTATTACACAGGGACTAAAAAGTTTC
AGTATGTGTTTTTTTCCGTCCCAG

>FGF-e reverse complement

CTGGGACGGAAAAAACACATACTGAAACTTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGATATAAAAAAGTTAT
TAAAGTATAAGAAAGATTTATAAACAAAACTACGAAATTTATTACGGAGATTCAACGATGTTGATG
AACCTATTTTTTCTCTCTGCGATTATGTGTCTAATGAAAACCTTCATTTCAAATGATGAAACGAC
TATTCAAAGAAATAAACAGAGTATTATTGGATCCATCATTGCAAGATAGGACGAAAAGCAAGC
TAAAGATATCTATAAAAAATGATTTGCTTTATAAAAAACATAACAACACCTTCATACACTACCACG
GTATTTCTCTATTCAAAGCTTGGATATTATTTAACAATAAACGAAAGTGGAACATTATGGGAAC
ACTGGATACTAAATCACGTGATATTTTTTTTGAAGTTGAGTCATACGGAGTGTATTTTAAAAGGT
TTCGAAAACCAAACCTCATGGTATATAGCTATTGACAACTTGAATTTATAAAAAACAAGGAAATAT
GGAAGAAAAGATACATTATTTCCGGTCATGTATAACGATGCAGGATGGGCATATTTTCAAATGA
TGCAACAGGTTTTGTGCTTGGTCTGCAACAAAACGGAAAACCAAAAAATAAATAGCTAACGTCA
CGCTACGGAATCGAAAAAACTTATTTTCTAATTCTAACACGTCCAGTGCTCCAACCATTTATCA
ACGATTTCGTAAATTATTTTCAAACCTTTTTTCTGTATAATATAGAGTAGTCAACAAAAATATTT
TTTAAATCAAACAATAAAATTTGTAAATATACATTTCTTTTATTTATCAAATAAAATTTGATTTTT
CTTTTGAATATATGAACTTACTTC

>FGF-f

GATATTTAAAAACATAGGAGGTGGCAATACTCAAACCTGATAAGGTGCAATCAATTTTTGGTGACC
ATTATTTAATACACATAACCACATCCGAAAACCTTATTTTTTCATCGTTATTCTTTGTAGTAGGT
TCTCGGCAAAAACCTTTTTGCGTTACTTGTGTTTATCGTTAGCACTTATTCAAAAAATAAAGTT
TGCGATAAAATATTTTTAAACAGAAAAGGATTTAAATGATTTCGAATGAATGGTTTAAACGAGT
CACATTTATTACTTTGAGCATGGTTTTTTATTTCTTTATCGATCCAATCATCTCCTCCTGTTACTA
CTTCAAAGTCCATGGAGGAACCTACGAAGTCGATATATGAAGACCAATTTGAAGGTTTCGCTTGCA
GAACCGACTCATGATCAACAAAATTTTTACGACGCTACAGTAAGCGATGCAATGGAGTTATATTC
TATATCAGCAAAACGTCTTGTTATTGTTCAAGACAAACCTGGAACCAACCTTGGGATCATGAAT
CAGAATTAATAATTAACAAAAACAGAGAATATACGGAAGAGAAAATCAGTTTGTACTGAGACA
GTTTCGTACGGGCGATTAAAGATCAAGTCAGAATACGCCAAGCAATATTTGTGTGTGAAAAATGA
CGGTGTTATTTCTTTAAAGCAAAATGCTGATAGTAGCAAAAACCAACCGTTACAGAAAGCGATGTC
TTTTCAATATGAATCTTACTCAACTCATGCATATTACATTATCCGTCTATATCGGTAAAACAACC
TGGTATTTAACTGTAAAAGATGATGTTATTTCTATGACTGACAATCTTCGAAGTAATGAACTAGA
ACGATCGTTTCATGTGGCTTCCAACGATGAGTGGCACTAGCCTAGCACCATCAAGACTGAGAAGTT
TTGATGATAAATCTCGGACTGTTTGTGATTCTTCCAATAAAAGAATAACCAATCAAATAAAAAAA
ATTAAAGAACTTCAAACGAAGTAAATAAATTAATGATGAAATTGAAAAGATGAAATTGGAAAA
TTTAAAAAAAATTAAGTTGACTAATTTGAAAAAATGCAAAAATAAAGGTTGTAAATTTTCATAG
GGTGTATCTTGTGGATTGATACGCCCACTATGAATGTCATAAGTCAATAACGACGTCGTCATTCA
GCGCAACAAAGTCCACATTGTGGGTTTCAATCATTGTAGAACTACAAAATTTATTTAAACGCA
TTTTAAAAACAGTATTGTATCATAGTTTTTATGTTTATTTTATTATGACTAGGCGTTATTTTTGA
CTGCGACGTTAAGTAAACGTCGTGTAGACGATTAATGAGCAGACTACGAAAAGGAAGATCAAAC
TGTAATACGAACTCTTGCAATAAGCTTAAAAAGTTCTTTCTTTTAACCTTTTTTTCCTTTTAT

>FGFRb_ex

ACGGAAAAAACACATACTGAAACTTTTTAGTCCCTGTGTAATAAGCAAAATGATATCAGATTGG
TGTGTTATTTTGGTTCTATCAATTTCAAGATTAGTTTTTGGGATAAATTTTACAGAGCCAGTTAA
TTATATATTGAAAGTAGGAGAAAATAATTCATCTAGACTATTAGATTGTTTCAGTTGATCTTTCTG
TTGAATTAATTAAGAATGATTGGACATACAATGGTATTGTTATTAATAAAAAACCTAATGTA
ACATTCCTGACAAAGGTCAAAAACCTTATTATTGGTCATTATAAATCCCAAAATTTCTGGTCGCTA
TGGGTGTAAAGTTACAGCTGTAAAGTGAAGAATCTGTTGAAAGGATATTTGATCTACTGCCACAT
CAGATCTGATGCCAAGAATAAAAAATGATATTTTCATTGCTTGTGAGTTAGTGATGAATAAATTA
GATTTGGATTGTACTGCTGTAGGTGCTTCACCTATTAGTATCATGTGGTTAAAAAATGATAAACT
GATTGAAGCAAGATCTAACTTACGTTATTATTTCTCACCAATTTTTTAAACTAAGTATAAAG

AGGTGAGACTCGATGATGCTGGTATTTACAAATGCATCTTGGAAAATAAATATGGCAAGGTAGAA
CATGTAATGACTGTTGAAATATATGAGAAAATGTTGCTAAACCAATAGTATCATCTACAGACAA
ACATAAAGTTTTTTTTATGTCGACTATGGTCAGAATTTAACTGTCCCTATATATGTTACTGCATTT
CTACCTAACCTCACTTTTCAAATGTTTATACGTTTACAGCATGACAAATCCAAA

>FGFRb_in

ATGTTAAATACATTTCTTTCAAATTAATATATAAAGCAACTAAAAGTAGCATAAAAAAGTATTACA
GAATAAATAAAATTAACATATAAAAAATAATCCATTTTTTTTTATATAAAAAATTGTTAATATTTTA
CATACTCATTATTTTGGCTCGTTTAAAGAACTTTATCTTTAGTGTTTAAAGAACTTTATCTTTAGTG
TTTAAAGAACTTTATCTTTAGTGTTTAAAGAACTTTATCTTTAGTGTTTAAAGAACTTTATCTTTAGT
GTTTAAAGAACTTTATCTTTAGTGTTTAAAGAACTTTATCTTTAGTGTTTAAAGAACTTTATCTTTAG
TGTTTAAAGAACTTTATCTTTAGTGTTTAAAGAACTTTATCTTTAGTGTTTAAACTTAATTCATAA
TGCTTGCAATTTCTATTTTAAACATTTAAAAGTTTTATTGCCATATACATTATGACATTGATACTA
CATTGTAAAAATATGGCTTCTAAAAAACTAATTCTGAAAACATATATGAAATTTGTGTTTGTA
AAAATAAGAAAAAATGTTGAAACATCAAATGTGTACGCTAGAACACGAATCAAAGATGAATATG
CTTAAAAATGTTCTGACATTTTCTTAAATTAATTGACAAATAACTCATCAGAACATGTTAAAAAA
ACAACATTTTTTATAAAAAAATATGAATTAATATTTATATTTATATATATACATATATATGATT
TAAACAAGTCATAAATGTTAAGACACTCTTTAGTGTTTAAATGACTAAATTCAAAGTCCTTTTTT
GAAAAGCTCATTTATTTCGAATTGGAAATCACGAACCTTTAATTCTAGCTGCAAGTTCATATTTAA
CATTATTTTTTATTAATTATTAATGATCCAAAAGGATTTTGGATCTTTTCGCAAAAAAATGGAAAT
GAAATGTCAAAATGAAAGAAGAATATGAAATGAAAGGCTAAATGTTATACAAGTTAATGTAAAG
CAATCGTTTAATCATTTAGAGCAACTAAAAAACCAAGTTCACATGTAAAAAACTGCGTTCAAGA
AACTACTTGGTAATTAAGAAGAACATCTGCTTCTGATAAACCATTTTTTATGAGTAAAGGACACTT
CATCGTGATCATATTTATGTTTGTAAACAAATCTGTATTCAACATGCTTGCAGAAGTGTTGATT
GAGGTTGAAAGTAACTCTGCGCACTCTGGTTGGATTGGTTGAAGATCTATATATTCTGTAGAAGT
TGCATCCAATAGCATTTTTTCTAGATCTTCAATTAGTTGTGAAAATGTGCGGACGTTTTAATGGGA
TTTCTTTCCAGCAATTTAGCATAAGTGCATACATATCATCAGTACAATTAAGTGGTTTTTCCATT
CGATAGCCTTGCTTTAATAAATCAAACATTTTTTCCAATGCAATTCCAGGGTAGGGTGATCCACC
AAATGTTACAATTTCCCATGCCAAAATTCCAAATGACCATATATCACTTCGAGTAGTAGTAAAT
ACGATTCAAACAAAGCTTCAATTGCCATCCATTTGATGGGTAATCGCCCATCTGT

>FGFRb_in reverse complement

ACAGATGGGCGATTACCCATCAAATGGATGGCAATTGAAGCTTTGTTTGATCGTATTTTACTACT
ACTCGAAGTGATATATGGTCATTTGGAATTTTGGCATGGGAAATTGTAACATTTGGTGGATCACC
CTACCCTGGAATTGCATTGGAAAAAATGTTTGATTTATTAAGCAAGGCTATCGAATGGAAAAAC
CACTTAATTGTACTGATGATATGTATGCACCTTATGCTAAATTGCTGGAAAGAAATCCCATTAAAA
CGTCCGACATTTTCACTAAATGAAGATCTAGAAAAAATGCTATTGGATGCAAGTTCTACAGA
ATATATAGATCTTCAACCAATCCAACCAGAGTGCGCAGAGTTACTTTCAACCTCAATACACACTT
CTGCAAGCATGTTGAATACAGATTTGTTTAAACATAAATATGATCACGATGAAGTGTCCTTT
ACTCATAAAAAATGGTTTATCAGAAGCAGATGTTCTTCTTAATTACCAAGTAGTTTCTTGACGCA
GTTTTTTTACATGTGAACCTGGTTTTTTTAGTTGCTCTAAATGATTAAACGATTGCTTTTACATTA
ACTTGTATAACATTTAGCCTTTTCATTTCAATTTCTTCTTTCATTTTGACATTTTCATTTCCATTTT
TTTGCGAAAGATCCAAAATCCTTTTGGATCATTTAATAATTAATAAAAAATAATGTTAAATATGAA
CTTGCAGCTAGAATTAAGGTTTCGTGATTTCCAATTGCAATAAATGAGCTTTTCAAAAAGGACTT
TGAATTTAGTCATTTAAACACTAAAGAGTGCTTAAACATTTATGACTTGTTTAAATCATATATA
TGTATATATATAAATATAAATATTTAATTCATTTTTTTTATAAAAAATAGTTGTTTTTTTAAACAT
GTTCTGATGAGTTATTTGTCAATTAATTTAAGAAAATGTCAGAACATTTTTTAAGCATATTCATCT
TTTGATTGCTGTTCTAGCGTACACATTTGATGTTTCAACATTTTTTCTTATTTTTTACAAACACAA
ATTTTCATATATAGTTTTTCAGAATTAGTTTTTTTAGAAGCCATATTTTTTACAATGTAGTATCAATG
TCATAATGTATATGGCAATAAACTTTTAAATGTTAAAAATAGAAATGCAAGCATTATGAATTA
GTATTAACACTAAAGATAAAGTTCTTAAACACTAAAGATAAAGTTCTTAAACACTAAAGATAA
GTTCTTAAACACTAAAGATAAAGTTCTTAAACACTAAAGATAAAGTTCTTAAACACTAAAGATAA
AGTTCTTAAACACTAAAGATAAAGTTCTTAAACACTAAAGATAAAGTTCTTAAACACTAAAGATA
AAGTTCTTAAACACTAAAGATAAAGTTCTTAAACGAGCCAAAATAATGAGTATGTAAATATTTAA
ACAATTTTTTATATAAAAAAATGGATTATTTTTTATATGTTAATTTTTATTTATTCTGTAATACTTT
TTATGCTACTTTTAGTTGCTTTATATTTAATTTTGAAGAAATGTATTTAACAT

>HvFGFRL1
 TTATTTATTAAATAAACTTTGATGCGAAATGAAATTATACGACGTAATACCAAAAAAACAGCG
 GTAGTTATGCACTGCTTCATTTGTTTGACATTCTTATGCCTCGCATTATCGGACAACACATTACC
 TAAAAAAAACAGTTTTATGGAAAACATGAAAACGGTGCGAGTGAAATGAATAATGAAATAGAGT
 CATTGAACCCATCGTTCCGCAAACCGTTGTTTATGAAGTATTCAAACAGTAAAATTTATACTCAT
 GGAATGACCTTATTTTAACTTGCATGGCAACAGGAGAAAAACCATTAAAGTACACCTGGATGTA
 TAACGGAGAAGTTATAGCAGCCAAAAAAGATTAAAGTTTGCGGAAGATCAATCCATGTTGAAAA
 TAAAAAGATTACGTGAAAGTGACGCAGGTTTCTACACTTGCACAGTTAGCAATAGTTTTGGAAAT
 CTATCATTCACCTTACAACATTAAATTAATAAGTCTAAAGTCAAAAGTACCATCCTTTCCAGACTA
 CGAAATGATGTTACGCAAAACAGAAAAATATTAGAGCGACAAAACAAGCTATAAAACTACCGTGTC
AAGCTCATGCCGACAATGGTGTGCATTACATATGGCTTAAAAATGGTGAACCTTTTAGACACGTG
CCTATTCAAAATGAAAACACCTTGAAGTCTGAGAATGCTGAAGTTGGTGACTTGATTTTTGAAAG
 TCTTAAAGTAAACGATGCTGGTTTGTATACATGCGTAGCAATTAATGACTTTGGAAATATTTTCAT
 TCACCTATGAACCTAAGGATATTGTGGAACTAAGTGCTGGTCCACCAAAGTTATACCTTTTACA
 AAACCACAATTTCAAATTGCTAAAGTTGGCGAAAATGTAACGTTTGAGTGTTTAGAAATATTATC
 CGGAACCTATACCAGACGTACGTTGGTTTCATTTGTTCAACAAGAAGATCGCTTAAACTGCCTG
 TTATTCCAGAAGACTTTTCGATGGAACGACGTTAATCAAAAAGAGATGCCTTTTGAATCAAATTAT
 GTTTCAGCTGATCATTACTCTGTTTTTAAATTGAAGACAGCATATCATAAGCCAATGAACATGTA
 TGTTTCATGATGATACAGACCCATATGGTTTACGTTTGACAATTACAAACGTAACAACCATGGACA
 CCGGAGTTTATACTTGCTTTGTTTCAAACTTTGAAGGAAGTGATTATTCCTTCTTTTCTTGCAA
 GTGCAGTGAATAAAATTTTCCCAGACAAAAAAGCATAAAAAATACCAGTATAAAACCACGAAAA
 AACCTACATCACGAAAACGTCATGTTACTTTTCTAAAAATGTACTGCTGTAAATATTTTTGGAAT
 GAACTTTTTTCTAACTTAAATTTAAAGTACAAATAACAAAAAACGAAATTATAAAATTTTTT
 ATAATAATGTTAAATATTGACTTGTGTATTATATGTGCTAAAAGTGTATATTAGGAATCTGCCTT
 TTGTATTTAAATAGACCCCTTACAGTATATTAAATATACCCCATATCTTCTTGACATAGTTTTG
 TTATTTTAAATGCTCACTCTTAAATTTATCGTTGTCGCACCATATTATAATTTAGTGAGTATGGAA
 TTTAGTTTACGGT

Abbildung 7.8: Sequenzen von FGF-a bis FGF-f und FGFRb und HvFGFRL1 aus Compagen.
 Einfach unterstrichen: *forward* Primer zur Isolierung der Sequenzen, doppelt unterstrichen *reverse*
 Primer zur Isolierung der Sequenzen, pink: Base, in -3 vor dem Start-Codon, die das Kozak-
 Kriterium erfüllt, hellblau: Start-Codons, rot: Stop-Codons.

Tabelle 7.1: Klonierungsdaten der *Hydra vulgaris* AEP FGFS

Art	Name des FGFS	Accession-Nummer	Datenbank	Klon	PCR Fragment
<i>Hydra vulgaris</i> AEP	FGFA_HAEP	HAEP_T-CDS_v02_7803	Compagen	FGFa2	514
<i>Hydra vulgaris</i> AEP	FGFB_HAEP	HAEP_T-CDS_v02_10362	Compagen	kein Klon	598
<i>Hydra vulgaris</i> AEP	FGFC_HAEP	HAEP_T-CDS_v02_11252	Compagen	FGFc2	675
<i>Hydra vulgaris</i> AEP	FGFE_HAEP	HAEP_T-CDS_v02_45195	Compagen	FGFe2	601
<i>Hydra vulgaris</i> AEP	FGFF_HAEP	HAEP_T-CDS_v02_48314	Compagen	FGFf3	494

Tabelle 7.2: Sequenzdaten von FGFRb und HvFGFRL1 aus Compagen

codierter Bereich	Name	Accession-Nummer	Datenbank
Ig-ähnliche Schleifen I-II	FGFRb_ex	HAEP_T-CDS_v02_12117	Compagen
Tyrosinkinase-Domäne	FGFRb_in	HAEP_T-CDS_v02_12974	Compagen
Ig-ähnliche Schleifen I-III	HvFGFRL1	HAEP_T-CDS_v02_4130	Compagen

Tabelle 7.3: Alle FGFs der verschiedenen Spezies, die für den Stammbaum benutzt wurden

Spezies	Name des FGFs	Accessionnummer	Datenbank
<i>Homo sapiens</i>	FGF22_HOMSA	AAQ89955.1	GenBank
	FGF20_HOMSA	NP_062825.1	GenBank
	FGF18_HOMSA	AAH06245.1	GenBank
	FGF17_HOMSA	AAI43790.1	GenBank
	FGF16_HOMSA	NP_003859.1	GenBank
	FGF14_HOMSA	Q92915.1	GenBank
	FGF13_HOMSA	Q92913.1	GenBank
	FGF12_HOMSA	AAH22524.1	GenBank
	FGF11_HOMSA	NP_004103.1	GenBank
	FGF10_HOMSA	CAG46466.1	GenBank
	FGF9_HOMSA	P31371.3	GenBank
	FGF8_HOMSA	NP_006110.1	GenBank
	FGF7_HOMSA	P21781.1	GenBank
	FGF6_HOMSA	P10767.4	GenBank
	FGF5_HOMSA	P12034.4	GenBank
	FGF4_HOMSA	P08620.1	GenBank
	FGF3_HOMSA	NP_005238.1	GenBank
	FGF2_HOMSA	NP_001997.5	GenBank
	FGF1_HOMSA	AAH32697.1	GenBank
<i>Xenopus laevis</i>	FGF1_XENLA	NP_001086257	GenBank
	FGF2_XENLA	NP_001093341	GenBank
	FGF3_XENLA	AAI06383	GenBank
	FGF4II_XENLA	NP_001079293	GenBank

	FGF4I_XENLA	NP_001079292	GenBank
	FGF7hyp_XENLA	NP_001089637	GenBank
	FGF8_XENLA	CAA71365	GenBank
	FGF9_XENLA	NP_001079276	GenBank
	FGF13_XENLA	A6P7H6	GenBank
	FGF20_XENLA	NP_001083766	GenBank
<i>Xenopus tropicalis</i>	FGF10_XENTR	NP_001016169	GenBank
<i>Danio rerio</i>	FGF1_DANRE	NP_957054	GenBank
	FGF2_DANRE	NP_997988	GenBank
	FGF3_DANRE	NP_571366	GenBank
	FGF4_DANRE	NP_571710	GenBank
	FGF5_DANRE	NP_001009561	GenBank
	FGF6_DANRE	AAO15997	GenBank
	FGF7_DANRE	NP_001007762.1	GenBank
	FGF8A_DANRE	NP_571356.2	GenBank
	FGF8B_DANRE	NP_878276.1	GenBank
	FGF10_DANRE	AAH94986.1	GenBank
	FGF11_DANRE	NP_001012380	GenBank
	FGF12_DANRE	BAD72886.2	GenBank
	FGF13_DANRE	XP_005173268.1	GenBank
	FGF14_DANRE	NP_001012382.1	GenBank
	FGF16_DANRE	NP_001035497.1	GenBank
	FGF17B_DANRE	NP_999973.1	GenBank
	FGF18A_DANRE	NP_001013282.1	GenBank

<i>Ciona intestinalis</i>	FGF18B_DANRE	NP_001012379.1	GenBank
	FGF20B_DANRE	NP_001034261.1	GenBank
	FGF20A_DANRE	NP_001032180	GenBank
	FGF22_DANRE	NP_001035184.1	GenBank
	FGF456_CIOIN	NP_001027747.1	GenBank
	FGF81718_CIOIN	NP_001027648.1	GenBank
	FGF11121314_CIOIN	NP_001027733.1	GenBank
<i>Nematostella vectensis</i>	FGF1A_NEMVE	ABN70831.1	GenBank
	FGFA_NEMVE	XP_001629624.1	GenBank
	FGF8B_NEMVE	ABN70837.1	GenBank
	FGF8A_NEMVE	ABN70836	GenBank
	FGFE_NEMVE	XP_001635198.1	GenBank
	FGFB_NEMVE	XP_001629071.1	GenBank
	FGFC_NEMVE	XP_001629323.1	GenBank
	FGFD_NEMVE	XP_001641663.1	GenBank
	FGF1C_NEMVE	ABN70833.1	GenBank
	FGF1B_NEMVE	ABN70832.1	GenBank
	FGFF_NEMVE	XP_001621706.1	GenBank
<i>Hydra vulgaris Zürich</i>	Hv_FGF12	CN777327	GenBank
<i>Hydra vulgaris AEP</i>	FGFA_HAEP	HAEP_T-CDS_v02_7803	Compagen
	FGFB_HAEP	HAEP_T-CDS_v02_10362	Compagen
	FGFC_HAEP	HAEP_T-CDS_v02_11252	Compagen
	FGFE_HAEP	HAEP_T-CDS_v02_45195	Compagen

	FGFF_HAEP	HAEP_T-CDS_v02_48314	Compagen
<i>Hydra vulgaris</i>	Wenger_sFGF8	HAAC01005678	http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view
	FGFA_HYDVU	XP_002166704.2	GenBank
	FGFB_HYDVU	XP_002170051.1	GenBank
	FGFC_HYDVU	XP_00216549	GenBank
<i>Hydra magnipapillata</i>	FGFA_HYDMA	XP_002164870.1	GenBank
<i>Lottia gigantea</i>	FGFB_LOTGI	ESP00064.1	GenBank
<i>Tribolium castaneum</i>	FGFA_TRICA	XP_001813599.1	GenBank
	FGF1_TRICA	EFA09258.1	GenBank
<i>Ixodes scapularis</i>	FGFA_IXOSC	XP_002400933.1	GenBank
<i>Apis mellifera</i>	FGFA_APIME	XP_623927.2	GenBank
	FGFB_APIME	XP_001120331.2	GenBank
	FGF18_APIME	XP_003251790.1	GenBank
<i>Drosophila melanogaster</i>	BRA_DROME	NP_732452.1	GenBank
	PYR_DROME	AAF58624.3	GenBank
	THI_DROME	AAF58621.2	GenBank
<i>Brugia malayi</i>	LET756_BRUMA	XP_001894505.1	GenBank
	EGL17_BRUMA	XP_001899322.1	GenBank
<i>Trichinella spiralis</i>	FGF18_TRISP	XP_003370630.1	GenBank
<i>Pristionchus pacificus</i>	EGL17_PRIPA	ABB84255.1	GenBank

<i>Caenorhabditis elegans</i>	LET756_CAEEL	CAA09234.1	GenBank
	EGL17_CAEEL	AAD00574.1	GenBank
<i>Acropora digitifera</i>	FGFA_ACRDI	adi_v1.21516	Compagen
	FGFB_ACRDI	adi_v1.07835	Compagen
	FGFC_ACRDI	adi_v1.10236	Compagen
	FGFD_ACRDI	adi_v1.10237	Compagen
	FGFE_ACRDI	adi_v1.18110	Compagen
<i>Lethenteron japonicum</i>	FGF81718_LETJA	JL5686	http://jlamprey genome.imcb.a- star.edu.sg/ http://jlamprey genome.imcb.a- star.edu.sg http://jlamprey genome.imcb.a- star.edu.sg http://jlamprey genome.imcb.a- star.edu.sg
	FGF91620_LETJA	JL14662	
	FGF371022_LETJA	JL2261	
	FGF5_LETJA	JL3015	
<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	FGF81718_BRALA	ACF17009	GenBank
	FGF12_BRALA	ACF17006.1	GenBank
	FGF91620_BRALA	ACF17010.1	GenBank

8 Abkürzungsverzeichnis

AER	<i>apical ectodermal ridge</i>
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
ALP	Alsterpaullon
Am	<i>Apis mellifera</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Bf	<i>Branchiostoma floridae</i>
Bnl	Branchless
bp	base pair
bs	Basalscheibe
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
CaCl ₂	Calciumchlorid
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
Ce	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ci	<i>Ciona intestinalis</i>
cm	Zentimeter
Ct	<i>Capitella teleta</i>
d	day/Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DECP	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin

Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
dpERK	double phosphorylated extracellular signal-regulated kinase
Dr	<i>Danio rerio</i>
ECM	extrazellulären Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGL	egg laying defective
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FGFRL1	fibroblast growth factor receptor like 1
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Gg	<i>Gallus gallus</i>
h	hour/Stunde
HCl	Salzsäure
His	Histidin
Hs	<i>Homo sapiens</i>
Hm	<i>Hydra magnipapillata</i>
HM	Hydra medium
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan

Hv	<i>Hydra vulgaris</i>
Hy	<i>Hydra</i>
hyp	Hypostom
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
I-Zellen	interstitiellen Stammzellen
kb	Knospenbasis
KCl	Kaliumchlorid
K ₂ CO ₃	Kaliumcarbonat
kDa	Kilodalton
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
kp	Knospemplakode
LB	Luria Bertani
LiCl	Lithiumchlorid
LET	lethal protein
Lg	<i>Lottia gigantea</i>
M	Molar
MAB	Maleinsäurepuffer
MAB-B	Maleinsäurepuffer mit 1 % BSA
mg	Milligramm oder Mesogloea
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimolar

μm	Mikrometer
N_2	flüssiger Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitrotetrazoliumblausulfat
NDK	Nou-Darake
ng	Nanogramm
NLS	<i>nuclear localization signal</i> /Kern-Lokalisierungs-Sequenz
nm	Nanometer
Nv	<i>Nematostella vectensis</i>
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBT	PBS mit Triton X-100
PBTw	PBS mit Tween 20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
Pyr	Pyramus
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
rb	rabbit
rpm	<i>revolutions per minute</i> /Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

S-S	Disulfidbrücke
sB	saure Box
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Signalpeptid
st	Stadium
tb	Tentakelbasis
Tc	<i>Tribolium castaneum</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
Ths	Thisbe
TK	Tyrosinkinase-Domäne
TM	Transmembran-Domäne
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TS, ts	Tentakelspitze
ÜN	über Nacht
VE	voll-entsalzt
WISH	<i>Whole Mount in situ</i> Hybridisierung
WNT	<i>Wingless</i> und <i>Int-1</i> (Maus Gen)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -glucuronid
XFD	<i>Xenopus</i> FGFR
Y	Tyrosinreste
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: FGFs im Tierreich.....	7
Abbildung 2.2: Schematische Struktur der Wirbeltier FGFs.....	9
Abbildung 2.3: Proteinstruktur von FGF1 mit 12 anti-parallen β -Faltblättern.....	9
Abbildung 2.4: Einteilung der 22 Wirbeltier FGFs in 7 Unterfamilien.....	10
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Vertebraten FGF-Rezeptoren 1-4 und einer Isoform vom humanen FGFR1.....	15
Abbildung 2.6: FGF Ligand-Rezeptor-Komplex.....	17
Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Struktur von FGFR1 der Vertebraten.....	18
Abbildung 2.8: FGFR1 bindet FGF mit unterschiedlicher Affinität.....	20
Abbildung 2.9: Morphologie von <i>Hydra</i>	23
Abbildung 2.10: Aufbau des Nervensystems von <i>Hydra</i>	24
Abbildung 2.11: Zelldifferenzierung und Zellmorphologie der Zelllinien bei <i>Hydra</i>	25
Abbildung 2.12: Schematischer Aufbau und Struktur der Mesogloea von <i>Hydra</i>	26
Abbildung 2.13: Männliche und Weibliche <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	27
Abbildung 2.14: 10 morphologisch sichtbare Knospentstadien der Gattung <i>Hydra</i>	29
Abbildung 2.15: Zellbewegungen bei <i>Hydra</i>	31
Abbildung 2.16: Transkriptionsmuster von <i>fgfr</i> während der Knospung.	34
Abbildung 4.1: Stammbaum der FGFs basierend auf der <i>Core</i> -Region.....	62
Abbildung 4.2: Nukleotid- und abgeleiteten Proteinsequenzen für die <i>Hydra vulgaris</i> AEP FGFs: FGF-a, FGF-b, FGF-c, FGF-e und FGF-f.....	64
Abbildung 4.3: PCR zur Isolation der <i>Hydra vulgaris</i> AEP FGFs Sequenzen aus cDNA.....	70
Abbildung 4.4: <i>fgf-a</i> Transkription bei einem knospentlosen Polypen und während der Knospung von <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	71
Abbildung 4.5: <i>fgf-c</i> Transkription in einer adulten, knospentlosen <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	72
Abbildung 4.6: <i>fgf-c</i> Transkription während der Knospung von <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	73
Abbildung 4.7: <i>fgf-e</i> Transkription bei einer adulten knospentlosen <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	74
Abbildung 4.8: <i>fgf-e</i> Transkription während der Knospung von <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	76

Abbildung 4.9: <i>fgf-f</i> Transkription in einer adulten, knospenlosen <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	77
Abbildung 4.10: Dynamische Transkription von <i>fgf-f</i> während der Knospung von <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	79
Abbildung 4.11: <i>fgf-f</i> Transkription während der Regeneration von Kopf bzw. Fuß bei <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	81
Abbildung 4.12: Transkriptionsmuster von <i>fgf-f</i> bei <i>Hydra vulgaris</i> Zürich.....	83
Abbildung 4.13: <i>fgf-c</i> Transkription in der Testes von <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	84
Abbildung 4.14: <i>fgf-e</i> Transkription in der Testes von <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	85
Abbildung 4.15: <i>fgf-f</i> Transkription in der Testes von <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	86
Abbildung 4.16: Proteinsequenz von FGF-f mit Antikörper-Epitop in rot.....	87
Abbildung 4.17: Western-Blot für die zwei polyklonalen Antikörper gegen FGF-f.....	88
Abbildung 4.18: Western-Blot für präabsorbierten Antikörper gegen FGFRa, FGF-f und HvFGFRL1.....	89
Abbildung 4.19: Immunhistochemie mit präabsorbierten Antikörper gegen FGF-f und mit ausschließlich verwendetem 2. Antikörper bei <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	90
Abbildung 4.20: FGF-f Lokalisation in der oberen Körpersäule von <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	92
Abbildung 4.21: FGF-f Lokalisation innerhalb der Tentakelzone und in den Tentakeln von <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	93
Abbildung 4.22: FGF-f Lokalisation in der unteren Körperhälfte von <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	94
Abbildung 4.23: FGF-f Proteinlokalisierung während der Knospung von <i>Hydra vulgaris</i> AEP....	96
Abbildung 4.24: FGF-f Proteinlokalisierung in der Testes von <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	98
Abbildung 4.25: Mazerat -Immunhistochemie 1 für FGF-f bei <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	99
Abbildung 4.26: Mazerat-Immunhistochemie 2 für FGF-f bei <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	100
Abbildung 4.27: Proteinsequenz von FGFRa mit Antikörper-Epitop in rot.....	102
Abbildung 4.28: Lokalisation von FGFR bei <i>Hydra vulgaris</i> AEP mit Knospe Stadium 6.....	103
Abbildung 4.29: Lokalisation von FGFR bei <i>Hydra vulgaris</i> AEP mit Knospe Stadium 10.....	104
Abbildung 4.30: Strukturübersicht der Sequenzfragmente von FGFRb aus der Compagen Datenbank.....	105
Abbildung 4.31: Möglicher Rasterschub an Ende der Compagen-Sequenz FGFRb_ex.....	106
Abbildung 4.33: Alignment von FGFRa und der beiden Varianten von FGFRb.....	107

Abbildung 4.32: Struktur und vorhergesagte Proteinsequenz von FGFRb.....	109
Abbildung 4.34: Transkription von <i>fgfr-b_ex</i> während der Knospung bei <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	111
Abbildung 4.35: Struktur und abgeleitete Protein-sequenz von HvFGFRL1.....	113
Abbildung 4.36: <i>hvfgrl1</i> Transkription in einer adulten knospenlosen <i>Hydra vulgaris</i> AEP....	114
Abbildung 4.37 <i>hvfgrl1</i> Transkription während der Knospung von <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	116
Abbildung 4.38: <i>hvfgrl1</i> Transkription während der Regeneration von <i>Hydra vulgaris</i> AEP..	118
Abbildung 4.39: Proteinsequenz von HvFGFRL1 mit Antikörper-Epitop rot unterlegt.....	119
Abbildung 4.40: Western Blot für den Antikörper gegen HvFGFRL1.....	120
Abbildung 4.41: <i>fgf-f</i> Transkription bei, durch SU5402 entstandenen, „Y-Tieren“ von <i>Hydra</i> <i>vulgaris</i> AEP.....	122
Abbildung 4.42: Transkription von <i>fgf-c</i> bei <i>Hydra vulgaris</i> AEP, nach einer Alsterpaullon- Behandlung.....	123
Abbildung 4.43: Transkription von <i>fgf-f</i> bei <i>Hydra vulgaris</i> AEP, nach einer Alsterpaullon- Behandlung.....	125
Abbildung 4.44: Transkription von <i>hvfgrl1</i> bei <i>Hydra vulgaris</i> AEP, nach einer Alsterpaullon- Behandlung.....	127
Abbildung 5.1: Vergleich der Evolutionsszenarien mit und ohne Einbeziehung der bei <i>Hydra</i> <i>vulgaris</i> AEP gefundenen FGFs.....	131
Abbildung 5.2: Schemata zu Grenzen, Epithelzellmigrationsgeschwindigkeiten und FGF/FGFR Transkriptionsdomänen in <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	133
Abbildung 5.3. Model zur Funktion von FGF-c, FGF-f und HvFGFRL1 bei <i>Hydra vulgaris</i> AEP am Beispiel von ektodermalen Epithelzellen.....	145
Abbildung 5.4: Modell zur Funktion von FGF-f bei der Wanderung von Nematoblasten in <i>Hydra</i> <i>vulgaris</i> AEP.....	147
Abbildung 5.5: Model zur Funktion von FGF-c, FGF-e und FGF-f während der Ausbildung einer Testes und der Spermatogenese bei <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	148
Abbildung 7.1: pGEM-T Easy Vektorkarte.....	168
Abbildung 7.2: Western-Blot für präabsorbierten Antikörper gegen FGFRa, FGF-f und HvFGFRL1.....	168
Abbildung 7.3: Struktur und abgeleitete Proteinsequenz von FGFRb_ex, aus der Compagen	

Datenbank.....	169
Abbildung 7.4: Struktur und abgeleitete Proteinsequenz von FGFRb_in, aus der Compagen Datenbank.....	170
Abbildung 7.5: Aminosäuresequenz-Alignment von FGFRa und FGFRb-Fragmenten aus der Compagen Datenbank.....	171
Abbildung 7.6: Alignment der Nukleotidsequenzen von FGFRa, FGFRb1 und b2 und FGFRb-Fragmenten aus der Compagen Datenbank.....	173
Abbildung 7.7: Möglicher Rasterschub an Ende der Compagen-Sequenz FGFRb_ex.....	175
Abbildung 7.8: Sequenzen von FGF-a bis FGF-f und FGFRb und HvFGFRL1 aus Compagen.....	176

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: FGF-FGFR Liganden-/Rezeptor-Bindung.....	13
Tabelle 3.1: selbst designte Primer zur Isolation der cDNA, die für die verschiedenen <i>Hydra</i> FGFs, FGFRb und HvFGFRL1 codiert.....	45
Tabelle 3.2: Komponenten für second strand cDNA.....	46
Tabelle 3.3: Komponenten für Ligation.....	47
Tabelle 3.4: Komponenten für Insert PCR.....	49
Tabelle 3.5: Insert PCR-Programm.....	49
Tabelle 3.6: Ansatz für die Sondensynthese.....	50
Tabelle 3.7: Sondenverdünnungen.....	53
Tabelle 3.8: Antikörper-Epitope und vorhergesagte Eigenschaften.....	54
Tabelle 3.9: Daten zur Erzeugung der Antikörper.....	55
Tabelle 3.10: Komponenten für ein 12,5 %iges und ein 15 %iges Trenngel.....	55
Tabelle 3.11: Komponenten für ein 3 %iges Sammelgel.....	56
Tabelle 3.12: Molekular Gewicht der Proteine.....	56
Tabelle 4.1: Liste möglicher FGFs in <i>Hydra</i>	61
Tabelle 4.2: Sequenzdaten der FGFs von <i>Hydra vulgaris</i> AEP.....	69
Tabelle 7.1: Klonierungsdaten der <i>Hydra vulgaris</i> AEP FGFs.....	179
Tabelle 7.2: Sequenzdaten von FGFRb und HvFGFRL1 aus Compagen.....	179
Tabelle 7.3: Alle FGFs der verschiedenen Spezies, die für den Stammbaum benutzt wurden.....	180

11 wissenschaftlicher Werdegang

Publikationen **Lange E**, Bertrand S, Holz O, Rebscher N, Hassel M (2014) Dynamic expression of a Hydra FGF at boundaries and termini. *Dev Genes Evol* 224(4-6):235–244. doi: 10.1007/s00427-014-0480-1

Hasse C, Holz O, **Lange E**, Pisowodzki L, Rebscher N, Eder CM, Hobmayer B, Hassel M (2014) FGFR-ERK signaling is an essential component of tissue separation. *Dev Biol* 395(1):154–166. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.08.010

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir durch ihre Unterstützung während meiner Doktorandenzeit die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben:

Bei Frau Prof. Dr. M. Hassel möchte ich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Möglichkeit zur Promotion und für die Betreuung dieser Arbeit danken.

Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl danke ich herzlich für die hilfreichen Anmerkungen, ihre Geduld und die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. U. Homberg und Herrn Prof. Dr. J. Schachtner danke ich vielmals für die Bereitschaft, Mitglieder meiner Prüfungskommission zu sein.

Mein besonderer Dank gilt den Mitgliedern der AG Hassel, vor allem Heide Brandtner, die immer für mich da war; ein offenes Ohr, viele hilfreiche Ratschläge für mich hatte. Außerdem danke ich Oliver Holz für seinen weißen Bart (weisen Rat), dass Korrektur lesen und für die guten Gespräche auf dem Balkon. Lisa Reichart danke ich ebenfalls für das Korrektur lesen und die Motivase.

Ebenfalls gebührt mein Dank Katja Gessner, die immer für noch eine Primer Bestellung Zeit hatte, mir freundlicherweise Photoshop erklärt hat und immer ein paar liebe Worte für mich hatte. Außerdem gilt mein Dank Mechthild Zissel, wir waren ein super Team in KM2.

Zum Schluss möchte ich noch meinem Bruder Steffen und meinen Freund Damian danken, die mich während meiner Promotionszeit immer unterstützt haben und während der Schreibphase viel Geduld hatten.

13 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Identifizierung und Charakterisierung von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren und -Rezeptoren bei *Hydra*

unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Monika Hassel (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 29. April 2016

Ellen Lange

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Originalpublikation veröffentlicht:

Lange E, Bertrand S, Holz O, Rebscher N, Hassel M (2014) Dynamic expression of a Hydra FGF at boundaries and termini. Dev Genes Evol 224(4-6):235–244. doi: 10.1007/s00427-014-0480-1